

Université de Montréal

Rôle de la vitamine K dans le processus de tumorigénèse mammaire
chez le rat

Par

Stéphanie Potvin

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
En Nutrition

Août 2003

© Stéphanie Potvin, 2003



QU

145

U58

2004

V. 008

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle de la vitamine K dans le processus de tumorigénèse mammaire chez le rat

présenté par :

Stéphanie Potvin

À été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Michèle Houde-Nadeau	Président rapporteur
Dr Guylaine Ferland	Directeur de recherche
Dr Parviz Ghadirian	Membre du Jury

Mémoire accepté le : _____

Sommaire

Dans les dernières années, des travaux ont mis en évidence un rôle potentiellement néoplasique de la vitamine K. La phylloquinone en présence d'un carcinogène accélérerait la formation de tumeurs chez des animaux et augmentait les dommages induits par le carcinogène in vitro. Par contre, des travaux subséquents ont révélé un potentiel carcinogénique plutôt au niveau des formes synthétiques de la vitamine qu'au niveau des formes naturelles. Sur la base de ces résultats, obtenus avec l'utilisation de doses pharmacologiques de la vitamine, les objectifs de notre recherche ont été de confirmer ou d'infirmer si la forme naturelle de la vitamine K présentait un potentiel carcinogénique dans un contexte physiologique. Pour cela, des rats femelles Sprague-Dawley ont reçu, dès le sevrage, une diète adéquate (500 mg /kg) ou enrichie (2000 mg/kg) en phylloquinone. À l'âge de 53 jours, la moitié des animaux de chaque groupe a été traitée avec un carcinogène, le DMBA. Les animaux ont été sacrifiés 20 semaines après le traitement au carcinogène. L'apparition des tumeurs mammaires a été suivie par une palpation hebdomadaire et la tumorigénèse finale évaluée à l'autopsie. Afin de vérifier l'effet de la diète, les concentrations de vitamine K ont été mesurées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) dans les tissus suivants : foie, ovaire, rate, cœur et tumeurs. Le potentiel oxydatif de la vitamine a été étudié en dosant des marqueurs de l'oxydation des lipides plasmatiques (dienes conjugués et hydroperoxydes) et de l'activité antioxydante (GSH et GSSG). Parallèlement, nous sommes intéressées à une nouvelle protéine dépendante de la vitamine K, la growth arrest specific gene6 (gas6), impliquée dans les mécanismes de la régulation cellulaire et à une famille d'enzymes, marqueur de l'invasivité, les matrix métalloprotéases (MMP).

L'expression de gas6 a été étudiée dans les tumeurs et les tissus mous par western blotting et celle des MMP par zymographie.

La tumorigénèse dans son ensemble n'a pas été affectée de manière significative par la teneur en vitamine K de la diète et ce, même si les teneurs en vitamine K des organes ont augmenté significativement en fonction de la quantité de phylloquinone contenue dans la diète. Au niveau des marqueurs de l'oxydation, les dienes conjugués ont augmenté en fonction de l'apport en phylloquinone tandis que les hydroperoxydes n'ont pas été affectés. Le taux de GSH plasmatique a augmenté avec l'enrichissement en phylloquinone de la diète. Par ailleurs, l'expression des MMP-2 et MMP-9 ainsi que celle de la protéine gas6 n'a pas été affectée par la teneur en phylloquinone de l'alimentation des animaux.

En conclusion, l'utilisation de ce modèle de carcinogénèse chez des animaux nourris avec des quantités physiologiques de vitamine K n'a pas montré un potentiel carcinogénique de la vitamine. Malgré une accumulation de vitamine K plus grande dans les tissus des animaux nourris avec une diète enrichie en phylloquinone, la tumorigénèse ne s'est pas avérée significativement différente.

Mots clés: Vitamine K, phylloquinone, rat, carcinogène, dimethylbenz(a)anthracene (DMBA), oxydation, growth arrest specific gene6 (gas6), matrix metalloprotease (MMP).

Summary

Recent studies have suggested that vitamin K could play a role in tumour growth and may potentially amplify carcinogenic events. In the presence of a carcinogen, phyloquinone (vitamin K) appears to accelerate the formation of tumours in animal models and seems to increase deleterious effects induced by the carcinogen in vitro. However, subsequent studies using pharmacological doses of vitamin K have shown that a potential carcinogenic role is attributed more to synthetic forms of the vitamin than its natural form. In light of these findings our goal was to determine whether natural vitamin K plays a potential carcinogenic role under physiological conditions. To study this relationship more directly we assessed the effect of dietary vitamin K intake on mammary tumour burden and incidence in the rat using a carcinogen-induced tumour model. After weaning, female Sprague-Dawley rats were fed adequate (500 µg/kg) or enriched (2000 µg/kg) vitamin K diets. At 53 days half the animals of each group were treated with dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) a known carcinogenic model. After 20 weeks of treatment rats were sacrificed and tumour incidence and burden were assessed. Vitamin K content in key organs (spleen, liver, ovaries, tumours) was determined by high performance liquid chromatography as control of the dietary regiment. We also determined the oxidative stress by assessing the degree of conjugated dienes and hydroperoxides and evaluated the levels of antioxidant by dosing GSH and its oxidized form, GSSG in plasma. In conjunction, we also wanted to study a new vitamin K dependent protein, growth arrest specific genes 6 (gas6) which has been implicated in cell proliferation as well as matrix metalloproteases (MMPs) a class of enzymes that are markers in tumour invasion. Gas6 expression was determined by western blot, while

MMP activity was assessed by zymography. Both parameters were tested in multiple tissue types and tumours.

Tumour incidence and burden appeared to be not appreciably affected by dietary vitamin K intake despite the fact that vitamin K concentrations in organs significantly increased as a function of dietary phylloquinone intake. Regarding the oxidation markers tested, we found an increase in conjugated dienes as a function of phylloquinone intake whereas hydroperoxides appeared to be unaffected by vitamin K intake. We also observed an increase in plasma GSH levels with dietary vitamin K enrichment. MMP-2 and MMP-9 activity as well as gas6 expression seem to be unaffected by dietary phylloquinone in our model.

In conclusion, this model of carcinogenic induction in rats fed physiological quantities of vitamin K did not show a carcinogenic potential for the vitamin. Despite a significant accumulation of phylloquinone in the tissues tested for the vitamin enriched group, tumorigenesis was not appreciably different between test groups.

Key words: Vitamin K, phylloquinone, rat, carcinogen, dimethylbenz(a)anthracene (DMBA), oxidation, growth arrest specific gene 6 (gas6), matrix metalloprotease (MMP).

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
REMERCIEMENTS.....	xii
I. INTRODUCTION.....	1
II REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
1.La vitamine K.....	3
1.1 Généralités.....	3
1.2 Carence et toxicité.....	4
1.3 Structure.....	5
1.4 Aspects métaboliques.....	6
1.5 Aspects biochimiques.....	6
2.Protéines dépendantes de la vitamine K.....	8
2.1 Protéines impliquées dans la coagulation sanguine.....	8
2.2 Autres protéines.....	9
2.2.1 Ostéocalcine.....	9
2.2.2 Matrix Gla Protéine (MGP).....	10
2.2.3 Protéine S.....	11
2.2.4 Gas6.....	12

3. Vitamine K et néoplasie.....	15
3.1 Prophylaxie de la VK à la naissance et cancer chez l'enfant.....	15
3.2 Interaction néoplasie et coagulation sanguine.....	17
3.3 Cytotoxicité de la vitamine K.....	24
3.4 Rôle néoplasique via gas6.....	28
4. Hypothèse de recherche et objectifs de l'étude.....	30
4.1 Formulation de l'hypothèse de recherche.....	30
4.1 Objectifs de l'étude.....	30
III ARTICLE.....	33
IV DISCUSSION.....	58
1. Sommaire et discussion des résultats de l'article.....	58
1.1 Consommation alimentaire et évolution pondérale.....	58
1.2 Concentration tissulaire de vitamine K.....	58
1.3 Tumeurs.....	59
1.4 Oxydation des lipides plasmatiques.....	60
1.5 Antioxydants plasmatiques.....	61
2. Résultats complémentaires.....	63
2.1 Méthodologie.....	63
2.1.1 Zymographie MMP.....	63
2.1.2 Western blot Gas6.....	64
2.1.3 Analyse des données.....	64

2.2 Présentation des résultats.....	65
2.2.1 Expression des MMP-2 et MMP-9.....	65
2.2.2 Expression de Gas6.....	66
2.3 Figures résultats complémentaires.....	69
V CONCLUSION.....	81
VI RÉFÉRENCES.....	83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Composition de la diète administrée aux rats.....	51
Tableau 2	Concentration de la vitamine K dans les organes et les tumeurs.....	53
Tableau 3	Tumorigénèse.....	54
Tableau 4	Marqueurs de l'oxydation	56
Tableau 5	Antioxydants plasmatiques.....	57

LISTE DES FIGURES

Figure A	Structure moléculaire de la vitamine K.....	31
Figure B	Cycle de la vitamine K.....	32
Figure 1	Évolution pondérale.....	52
Figure 2	Apparition des tumeurs.....	55
Figure I	Expression des MMP-2 et MMP-9 selon le traitement.....	69
Figure II	Expression des MMP-2 et MMP-9 selon la diète.....	72
Figure III	Expression de Gas6 selon le traitement.....	75
Figure IV	Expression de Gas6 selon la diète.....	78

LISTE DES ABRÉVIATIONS

MK-n	Ménaquinones
VK	Vitamine K
DMBA	Diméthylbenzo(a)entracène
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion oxydé
MMP	Matrix Métalloprotéases
Gas6	Growth arrest specific gene 6
GLU	Acide glutamique
GLA	Acide gamma-carboxyglutamique
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PIVKA	Protein-induced during vitamin K deficiency or agonism
MGP	Matrix Gla Protein
BGP	Bone Gla Protein
kDA	kilo Dalton
RR	Risque relatif
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
BP	Benzo(a)pyrène
AHH	Arylhydrocarbène hydroxylase
GST	Gluthione S-transferase
ECS	Échanges de chromatides-sœurs

GPA	Glycophorine A
NS	Non significatif
AC	Aberrations chromosomiques
A	Adequate ou Adéquate
E	Enriched ou Enrichie

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier ma directrice de recherche, le Dre Guylaine Ferland de m'avoir donné l'opportunité de côtoyer le milieu fascinant de la recherche et surtout de m'avoir guidée dans ce projet.

Mes remerciements s'adressent également à Rafaella Vicaretti, l'assistante de recherche du laboratoire, pour son aide technique inestimable et son support moral. Sans oublier Isabelle Carrié, stagiaire post-doctorale, pour ses conseils, ses encouragements constants et son aide précieuse.

Je désire également remercier les organismes FRSQ et CRSNG et la faculté de médecine pour leur support financier.

Je tiens à souligner l'importance du support de ma famille, mes amis(es) et mes collègues de travail sans qui la réalisation de ce travail aurait été impossible.

Et finalement, Jimmy pour ta compréhension, ton support, ta présence et ton amour, merci!

I. INTRODUCTION

La vitamine K, une des quatre vitamines liposolubles (Suttie, 1985), participe à la modification post-traductionnelle de l'acide glutamique (GLU) en acide gamma-carboxyglutamique (GLA) de plusieurs protéines (Shearer, 1990). D'abord connue pour son rôle dans la coagulation sanguine, on sait maintenant que la vitamine K est également impliquée dans d'autres systèmes physiologiques dont la prolifération cellulaire (Ferland, 1998). L'importance de l'apport alimentaire en phylloquinone en regard du maintien de l'état nutritionnel en vitamine K a été démontré chez l'humain et la plupart des espèces animales. Bien qu'à ce jour la vitamine K ne soit pas considérée comme toxique pour l'organisme, des travaux ont montré une implication de la vitamine dans des processus néoplasiques.

Depuis l'étude de Golding *et al.* réalisée en 1992, où une association positive entre la prophylaxie en vitamine K chez le nouveau-né et le développement de cancer durant l'enfance a été démontrée, de nombreux travaux se sont penchés sur le lien entre la vitamine K et la néoplasie. Certaines études menées chez l'animal ont montré une augmentation de la tumorigénèse et du taux de mortalité chez des animaux traités à la phylloquinone alors que d'autres ont mis en évidence le caractère cytotoxique de la vitamine au plan cellulaire. La phylloquinone a en effet été associée dans certains travaux à une augmentation des dommages à l'ADN lorsqu'étudiée dans diverses lignées cellulaires. Toutefois, plusieurs autres études n'ont pu confirmer le potentiel néoplasique de la vitamine K. Par exemple, les résultats de Golding *et al.* observés chez le nouveau-né n'ont, à ce jour, pu être confirmés, tout comme ceux

relatifs à l'activité cytotoxique. Au contraire, certains résultats publiés ces récentes années suggèrent un rôle protecteur de la vitamine en regard de la néoplasie.

En somme, le rôle de la vitamine K dans les processus néoplasiques demeure un sujet de débat, surtout lorsqu'il est considéré à partir d'une perspective nutritionnelle. Il importe en effet de préciser que la toxicité de cette vitamine a jusqu'à présent surtout été étudiée dans un contexte pharmacologique. À la lumière de ceci et étant donné les conséquences du processus néoplasique sur la santé, nous avons donc entrepris d'étudier cette question plus avant, et ce dans un contexte physiologique. Plus spécifiquement, nous avons étudié l'effet d'une diète enrichie en phylloquinone (environ 3 fois l'apport recommandé) sur la néoplasie mammaire chez le rat, en utilisant un modèle de carcinogénèse bien établi, le Diméthylbenz(a)entracène (DMBA). De plus, nous nous sommes intéressées aux différents mécanismes d'actions par lesquels la vitamine K pourrait exercer son action.

II. REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

1. La vitamine K

1.1 GÉNÉRALITÉS

Découverte par Henrick Dam en 1929, la vitamine K est l'une des quatre vitamines liposolubles (Dam, 1942). On la retrouve naturellement sous deux formes, soit la phylloquinone (vitamine K₁) d'origine végétale, et les ménaquinones (vitamine K₂) (Suttie, 1985) une famille de composés (MK-n) d'origine bactérienne, à l'exception de la ménaquinone-4 (MK-4) (Ferland, 2001). Cette dernière n'est pas produite en quantité significative par les bactéries, mais elle est plutôt synthétisée dans les tissus à partir de la ménadione ou de la phylloquinone alimentaire (Thijssen, 1994 et 1996) (Davidson, 1998). Il existe aussi une forme synthétique de la vitamine, la ménadione (K₃), utilisée dans la fabrication de diètes animales et dans le cadre de travaux in vitro.

Les besoins nutritionnels pour la vitamine K sont établis à 90 µg par jour pour les femmes et 120 µg par jour pour les hommes (Trumbo, 2001). La phylloquinone est la source majeure de vitamine K dans l'alimentation. On la retrouve principalement dans les légumes verts feuillus, les noix, les légumineuses et quelques huiles végétales telle que l'huile de soya, de canola ou d'olive (Booth, 1993) (Bolton-Smith, 2000) (Booth, 1995). De plus, certains produits comme le foie, le yogourt, les fromages, les œufs et le beurre fournissent de la vitamine K sous forme de ménaquinones (Shearer, 1996). Jusqu'à tout récemment, on croyait qu'une grande partie des besoins en vitamine K de l'organisme pouvait être comblée par la synthèse

endogène de ménaquinones au niveau de l'intestin. Toutefois, des travaux récents ont démontré que cette source de vitamine était très peu biodisponible. Les ménaquinones, synthétisées au niveau du colon, se retrouvent en effet majoritairement dans les membranes des bactéries et leur absorption est par conséquent très limitée (Suttie, 1995).

1.2 CARENCE ET TOXICITÉ

La carence en vitamine K est peu fréquente chez l'adulte et est principalement associée à la maladie hépatique ou à des troubles gastro-intestinaux pouvant entraîner une malabsorption des lipides (Krasinski, 1985) (Blanchard 1981). Les patients hospitalisés ayant des apports ou un statut nutritionnel faibles sont aussi susceptibles de développer une carence vitaminique K (Suttie, 1992). De même, les nouveau-nés constituent un groupe à haut risque (Savage, 1983) en raison du faible transfert placentaire de la vitamine, de l'immaturité hépatique, laquelle est associée à une synthèse limitée des facteurs de coagulation, et à la faible teneur vitaminique K du lait maternel (Suzuki, 2001). Individuellement ou de concert, ces facteurs participent au syndrome hémorragique du nourrisson, une condition qui se caractérise par des saignements qui apparaissent dans la première semaine de vie (forme classique) ou entre la deuxième et la douzième semaine de vie (forme tardive) (Behrman, 1996). La forme classique se manifeste par des hémorragies d'origines diverses mais dont les plus fréquents sont de nature gastro-intestinale, cutanée ou nasale. Les hémorragies intra-crâniennes représentent quant à elles plus de la moitié des cas associés à la forme tardive. L'administration prophylactique de vitamine K à la naissance permet

de prévenir la forme classique du syndrome mais est moins efficace à réduire les risques de la forme tardive (Von Kries, 1991). En conséquence, la société canadienne de pédiatrie (1997) recommandent depuis plus de trente ans l'administration d'une dose unique de 0,5 à 1,0 mg de phylloquinone par voie intramusculaire à tous les nouveau-nés au Canada. En cas d'opposition des parents, la vitamine K est administrée *per os* à la dose de 2,0 mg au moment du premier boire et est suivi d'un rappel entre la deuxième et la quatrième semaine, puis un autre entre la sixième et la huitième semaine de vie.

À ce jour, on ne connaît aucune toxicité aux formes naturelles de la vitamine K et ce, même en présence de grandes quantités (Food and nutrition board, 1987). Par contre, l'administration de ménadione, une forme synthétique de la vitamine, a été associée à de l'anémie hémolytique, à de l'hyperbilirubinémie ou à l'ictère nucléaire lorsque administrée chez l'enfant (Olsen, 1999).

1.3 STRUCTURE

La structure moléculaire de la phylloquinone se compose d'un noyau de naphtoquinone (2-méthyl-1,4-naphtoquinone) auquel est fixé un groupement phytyl. Les ménaquinones se distinguent par la présence, en position trois du noyau, d'une chaîne isoprénique de longueur variable. Cette chaîne contient de 4 à 13 unités isopréniques formant ainsi une famille de ménaquinones (MK-4 à MK-13) (Doisy, 1941). La ménadione se compose uniquement du noyau de naphtoquinone (Suttie, 1985). **(Figure A)**

1.4 ASPECTS MÉTABOLIQUES

La vitamine K est absorbée dans la partie supérieure de l'intestin grêle par un processus de transport actif nécessitant une solubilisation par la bile et les sucs pancréatiques (Shearer, 1992). Elle est ensuite incorporée dans les chylomicrons, est sécrétée dans la lymphe puis déversée dans la circulation sanguine (Vermeer, 1996). La phylloquinone circule dans le sang à faible concentration, les valeurs normales se situant entre 0,25 et 2,7 nmol/L (Sadowski, 1989). Le stockage de la vitamine K a longtemps été associé presque exclusivement au foie, toutefois, des études récentes ont rapporté la présence de la vitamine dans pratiquement tous les tissus extra-hépatiques et ce en quantité considérable (Thijssen 1994 et 1996). Le pool total de la vitamine K, calculé à 3,1 nmol/kg, étant faible comparativement aux autres vitamines liposolubles, les réserves hépatiques diminuent rapidement en présence d'apports limités (Newman, 1998). Le *turnover* de la vitamine K au sein de l'organisme est évalué à environ 24 heures (Olson, 1999), 40 à 50% de son excrétion s'effectuant par les fèces via la bile et 15 à 20 % par la voie urinaire (Shearer, 1974).

1.5 ASPECTS BIOCHIMIQUES

La vitamine K participe à l'activité biologique de nombreuses protéines présentes dans divers systèmes physiologiques. Spécifiquement, elle sert de cofacteur dans une réaction de carboxylation visant la transformation des résidus d'acide glutamique en résidus d'acide gamma-carboxyglutamique (GLA) (Shearer, 1995). Cette réaction est catalysée par une enzyme carboxylase microsomiale en présence d'oxygène (O₂) et de dioxyde de carbone (CO₂).

Tel que décrit à la **figure B**, l'hydroquinone, forme active (réduite) de la vitamine est transformée en cours de réaction en une forme époxyde, biologiquement inactive. Cette dernière est ensuite transformée, d'abord en quinone (forme intermédiaire) puis en hydroquinone grâce à deux réductases dépendantes de la présence de cofacteurs dithiols. Par ailleurs, la réduction de la quinone en hydroquinone est aussi possible par une autre enzyme réductase qui elle, dépend du NAD(P)H (Vermeer, 1990) (Suttie, 1985). L'ensemble de ces réactions constitue la cycle de la vitamine K.

Bien que très efficace en condition normale, le *recyclage* de la vitamine K est toutefois perturbé par certains composés dont la warfarine sodique tel que le Coumadin®, un anticoagulant largement utilisé en milieu clinique (Matschiner, 1974) (Whitlon, 1978) ainsi que certaines céphalosporines (Shearer 1988). Ces composés agissent en bloquant l'activité des deux enzymes réductases dépendantes des cofacteurs dithiols empêchant ainsi la reconversion de la vitamine en sa forme active (Vermeer, 2000). En revanche, la voie de réduction dépendante du NAD(P)H est relativement insensible aux effets de ces médicaments (Wallin, 1985).

Les résidus GLA communs à toutes les protéines dépendantes de la vitamine K, augmentent l'affinité de ces dernières pour le calcium, une propriété essentielle à leur activité biologique (Dowd, 1995). En absence de vitamine K alimentaire ou en présence d'un antagoniste, les protéines produites, appelées PIVKA (*protein-induced*

during vitamin K deficiency or antagonism), sont dépourvues de résidus Gla et sont partiellement ou totalement inactives (Suttie 1992). Depuis quelques années, les PIVKA sécrétées dans le plasma servent à l'évaluation du statut nutritionnel en vitamine K (Sokoll, 1996) (Ferland, 1993) (Suttie, 1988).

2. Protéines dépendantes de la vitamine K

2.1 PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LA COAGULATION SANGUINE

La vitamine K a d'abord été découverte pour son implication dans l'hémostase ; elle est en effet requise pour l'activation de sept protéines impliquées dans la cascade de la coagulation sanguine, la prothrombine (facteur II), les facteurs VII, IX et X et les protéines C, S et Z. La prothrombine et les facteurs VII, IX et X possèdent une activité pro-coagulante tandis que les protéines C et S agissent plutôt comme anticoagulants. (Nelsenstuen, 2000). Plus spécifiquement, les facteurs VII (voie exogène) et IX (voie endogène), activent le facteur X qui lui, permet la transformation de la prothrombine en thrombine et ainsi contribue à la formation du caillot de fibrine. Par ailleurs, les protéines C et S agissent en bloquant l'action des facteurs V et VIII (Newman, 1998). Enfin bien que la fonction physiologique de la protéine Z ne soit pas encore totalement élucidée, certains travaux suggèrent qu'elle pourrait potentialiser l'action de la thrombine (Olson, 1999).

Toutes les protéines discutées ci-haut possèdent entre 10 et 12 résidus Gla, une caractéristique leur permettant de lier le calcium et de s'associer aux

phospholipides membranaires des plaquettes sanguines et des cellules endothéliales au site de la blessure (Furie, 1999). Les protéines dépendantes de la vitamine K impliquées dans l'hémostase sont synthétisées exclusivement dans le foie, à l'exception de la protéine S qui a également été détectée dans l'os (Vermeer, 2000).

2.2 AUTRES PROTÉINES

2.2.1 Ostéocalcine

En marge des protéines de la coagulation sanguine, trois protéines dépendantes de la vitamine K, l'ostéocalcine, la Matrix Gla Protein (MGP) et la protéine S sont impliquées dans le métabolisme calcique. L'ostéocalcine aussi appelée Bone Gla Protein (BGP) est la première protéine de cette catégorie à avoir été découverte (Hauschka, 1989). Elle est synthétisée exclusivement par les ostéoblastes et les odontoblastes et représente 15 à 20% des protéines de l'os ce qui en fait une des protéines non-collagéniques les plus abondantes de l'organisme (Binkley, 1995). Cette protéine, de petit poids moléculaire (49-50 résidus), contient 3 résidus GLA lui conférant une haute affinité pour les cristaux d'hydroxyapatite (Price, 1988). Sa synthèse est modulée par la 1,25-dihydroxyvitamine D (Shearer, 1997) et l'acide rétinoïque (Ferland, 1998), et sa concentration au niveau de l'os est proportionnelle à son contenu en calcium (Binkley, 1995).

La fonction physiologique de l'ostéocalcine reste à préciser mais les travaux réalisés à ce jour suggèrent un rôle dans le remodelage osseux. En effet, elle agirait en favorisant le recrutement et l'activation des ostéoclastes impliqués dans la

résorption osseuse (Roach, 1994). Des rats traités à la warfarine sodique dans le but d'induire une déficience en ostéocalcine, ont démontré des anomalies osseuses dont une minéralisation excessive, la fermeture prématurée des plaques de croissance et un arrêt de la croissance longitudinale (Price, 1988). Plus récemment, on observait chez des souris dont le gène codant pour l'ostéocalcine avait été supprimé (souris *knock-out*), une augmentation de la masse et de la qualité osseuse. Lorsque comparées à des témoins de six mois d'âge, ces souris présentaient une augmentation de l'épaisseur et de la densité de l'os corticale. De plus, lorsque soumis à des tests biomécaniques, les os des souris knock-out étaient significativement plus forts et plus résistants que ceux provenant des souris témoins (Ducy, 1996).

La découverte de l'ostéocalcine, a amené la communauté scientifique à s'interroger sur la possibilité d'un lien entre les apports de vitamine K, la santé osseuse et les risques d'ostéoporose. Bien que des études épidémiologiques aient mis en évidence des associations négatives entre les apports de vitamine K et la qualité osseuse au grand âge (Feskanich, 1999), des essais cliniques en cours de réalisation devraient nous permettre de statuer plus précisément sur cette question dans les prochaines années (Shearer, 1997)(Binkley, 1995).

2.2.2 La Matrix Gla Protein (MGP)

Seconde protéine à avoir été associée à l'os, la Matrix Gla Protein (MGP), (Price 1985) se retrouve également dans les cartilages et dans la plupart des tissus mous dont le cœur, les reins, les poumons (Fraser, 1988) et les vaisseaux sanguins (Jie, 1995). Cette protéine comporte 84 résidus dont 5 résidus GLA. Comme pour

l'ostéocalcine, sa synthèse est modulée par la 1,25-dihydroxyvitamine D et l'acide rétinolique (Price, 1988).

La MGP est impliquée dans le métabolisme calcique cellulaire, plus spécifiquement dans l'inhibition de la calcification (Newman, 1998). Des travaux menés chez des souris ne possédant pas le gène codant pour la MGP (souris *knock-out*), ont montré que l'absence de MGP conduisait une calcification spontanée des artères et des cartilages. La calcification des artères a entraîné la rupture des vaisseaux sanguins provoquant une hémorragie et la mort des souris deux mois après leur naissance. Les conséquences de la calcification des cartilages ont été une plus petite stature de ces souris et une augmentation de l'incidence de fractures due à l'ostéopénie (Luo, 1997). Le rôle de la MGP dans la calcification des vaisseaux sanguins a aussi été montré en administrant des doses importantes de warfarine sodique. Ainsi, l'inhibition de la gamma-carboxylation de la MGP chez ces animaux a entraîné une calcification précoce et progressive, des artères et des valves aortiques cardiaques sans toutefois affecter leur croissance (Price, 1998).

2.2.3 Protéine S

En plus de son rôle dans la coagulation sanguine, la protéine S pourrait être impliquée dans le métabolisme osseux (Vermeer, 1995). En effet, au début des années 1990, on a rapporté deux cas de déficience congénitale de la protéine S présentant une sévère ostéopénie et une faible densité minérale osseuse (Pan, 1990). Des études ont par la suite confirmé d'une part, la synthèse et la sécrétion de la

protéine S par les ostéoblastes en culture et d'autre part la présence de la protéine dans des extraits de matrice osseuse humaine (Maillard, 1992). Cependant, le rôle spécifique de cette protéine dans la fonction osseuse reste à démontrer (Ferland, 1998).

2.2.4 *Gas6*

Identifié en 1993 par Manfioletti et ses collaborateurs, Gas6, un produit du *growth arrest specific gene6*, est une autre protéine dépendante de la vitamine K. Cette protéine a un poids moléculaire de 75 kDa, contient 11 à 12 résidus GLA et possède une structure similaire à celle de la protéine S, ces deux protéines partageant environ 43 % de leurs acides aminés (Manfioletti, 1993) (Nakano, 1995). Depuis sa découverte, elle a été détectée dans de nombreux tissus tels que le cœur, les poumons, l'estomac, le rein (Manfioletti, 1993), le cartilage (Loeser, 1997) et le cerveau (Prieto, 1999). Dans le cerveau de rat, les travaux d'immunohistochimie de Prieto *et al.* (1999 et 2000) ont montré que Gas6 est largement exprimée. On la retrouve notamment dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le thalamus, l'hypothalamus, le mésencéphale et le cervelet. Dans ces différentes régions cérébrales, bien que présente au stade embryonnaire, l'expression de Gas6 augmente durant le développement pour atteindre son maximum à l'âge adulte. Au cours du vieillissement, les taux de la protéine sont diminués. En effet, un déclin de plus de 84% a été observé dans le cortex frontal et de 55% dans l'hippocampe de rats âgés (Tsaïoun, 1999).

Sur le plan fonctionnel, Gas6 est le ligand de plusieurs récepteurs appartenant à la famille des tyrosines kinases. Elle se lie spécifiquement à trois sous-familles, Axl (Ufo/Ark), Sky (Dtk/Tyro3/Rse/Brk/Tif) et Mer (Eyk/Nyk), (Varnum, 1995) (Stitt, 1995) (Godowski, 1995) (Nagata, 1996). Ces récepteurs, exprimés au cours de l'embryogenèse, se retrouvent dans divers tissus tels que le cœur, le muscle squelettique, les ovaires, la moelle osseuse, le cerveau, les testicules, les reins, la prostate et les poumons (Croisier 1997). L'activation de ces récepteurs par Gas6 induit la phosphorylation de la tyrosine et ainsi assure la transduction du signal provenant du milieu extracellulaire. La liaison de Gas6 à ces récepteurs nécessite la présence des résidus Gla (Nakano, 1997) qui favorisent l'interaction de la protéine avec les phospholipides membranaires, et particulièrement avec la phosphatidylsérine. C'est ainsi que la partie C-terminal de Gas6 pourra se lier et activer ces récepteurs spécifiques (Nakano, 1997).

De façon générale, les récepteurs tyrosine kinases sont impliqués dans une variété de réponses cellulaires dont la prolifération, la différenciation et la survie. De nombreuses études ont montré que le rôle de Gas6, à travers ces récepteurs, était principalement la régulation de la prolifération cellulaire et la prévention de l'apoptose, c'est à dire la mort cellulaire programmée. Son rôle dans la régulation du cycle cellulaire a été démontré par des études *in vitro* de différents types cellulaires. L'équipe de Nakano *et al.*, ont observé d'une part que Gas6 favorisait la prolifération des cellules du muscle vasculaire lisse (Nakano, 1995) et d'autre part empêchait la mort de ces cellules conditionnées dans un milieu de culture sans sérum (Nakano,

1996). Son action sur la croissance cellulaire a aussi été mise en évidence dans les cellules de Schwann, qui sont impliquées dans la régénération des cellules nerveuses du système nerveux périphérique (Li, 1996). La mise en culture de chondrocytes issus du cartilage humain a permis de détecter la présence de Gas6 et de son récepteur tyrosine kinase Axl. Gas6 s'est révélé un facteur de survie à la fois pour les cultures primaires et immortalisées de chondrocytes exposées à un milieu sans sérum (Loeser, 1997). Au niveau de l'os, le récepteur le plus exprimé est Tyro3 et sa stimulation par Gas6 augmente l'activité de résorption osseuse (Nakamura, 1998).

Récemment deux études in vivo utilisant des souris ne possédant pas le gène codant pour Gas6 (*souris knock-out*) ont permis d'améliorer les connaissances sur le rôle physiologique de Gas6. La première étude a porté sur le rôle de Gas6 dans l'hémostase et la thrombose. Tout d'abord, les souris transgéniques générées étaient viables et ne présentaient pas de différences apparentes comparées aux témoins. En utilisant trois modèles différents de thrombose, les auteurs ont observé une diminution supérieure à 50% de l'incidence de thromboses artérielles et veineuses des souris *knock-out* comparativement aux témoins sans toutefois qu'elles ne présentent d'hémorragie spontanée ou induite par des traumatismes mineurs. C'est en examinant le métabolisme des plaquettes que la protéine Gas6 a été identifiée comme un amplificateur de l'agrégation plaquettaire. Ainsi cette étude a démontré que Gas6 jouait un rôle significatif dans la thrombose (Angelillo-Sherrer, 2001). Les auteurs de la deuxième étude se sont intéressés au rôle de Gas6 dans la glomérulonéphrite. À la suite de l'injection d'un sérum néphrotoxique, la réponse proliférative et les dépôts de

fibrine au niveau des glomérules étaient diminués chez les souris *knock-out* par rapport aux témoins. Ainsi, l'inactivation de Gas6 a ralenti la prolifération cellulaire conduisant aux dommages rénaux et à la progression des néphrites (Yanagita, 2002).

3. Vitamine K et Néoplasie

3.1 PROPHYLAXIE DE LA VITAMINE K À LA NAISSANCE ET CANCER CHEZ L'ENFANT

La vitamine K, lorsque administrée par voie intramusculaire chez le nouveau-né, a été identifiée comme un facteur de risque de néoplasie par l'équipe de Golding au début des années 1990. Une association positive significative était en effet rapportée lors d'une étude cas-témoin comprenant 195 enfants atteints d'un cancer et 558 enfants témoins, tous nés dans deux hôpitaux britanniques. Les enfants qui avaient été traités à la vitamine K à la naissance présentaient un risque au moins deux fois plus élevé de développer un cancer dans les premières années de vie (RR=2,16 (1,27 à 3,67)) lorsque comparés aux témoins; le risque relatif était plus important pour les leucémies, soit 2,65 (1,34 à 5,24), que pour tous les autres types de cancer, soit 1,72 (1,04 à 2,84) (Golding, 1992).

En raison de son impact potentiel sur la pratique clinique, la relation entre l'administration prophylactique de vitamine K par voie intra-musculaire et le risque de développer un cancer durant l'enfance a par la suite été vérifiée par des chercheurs

de la Suède (Ekelund, 1993), des Etats-Unis (Klebanoff, 1993), du Danemark (Olsen, 1994), des îles britanniques (Ansell 1996), de l'Allemagne (Von Kries, 1996), de l'Écosse (Mckinney, 1998) et du Royaume-Uni (Passmore, 1998). Les informations recueillies dans le cadre de ces études provenaient de plusieurs hôpitaux (3 à 162) et portaient sur des périodes allant jusqu'à 25 années. Le nombre de *cas* variait entre 48 et 2354, chacun d'eux était comparé à plus d'un témoin. Aucune de ces études n'a pu confirmer l'augmentation du risque de cancers chez l'enfant (incluant la leucémie) par suite de l'administration de vitamine K intramusculaire à la naissance. Par exemple, lorsque les données de 272 enfants ayant développé un cancer durant les quinze premières années de vie étaient comparées à celles de 334 enfants témoins (tous nés dans 162 hôpitaux allemands entre 1975 et 1993), aucune différence statistiquement significative n'était observée. Les risques relatifs pour tous les cancers et pour la leucémie était de 1,04 (0,74 à 1,48) et de 0,98 (0,64 à 1,50) respectivement (Von Kries, 1996).

Des associations positives entre l'administration de vitamine K à la naissance et le risque de développer une leucémie durant l'enfance ont toutefois été rapportées dans deux études subséquentes. Une augmentation de ce risque a en effet été observée par Parker *et al.* (1998) entre la première et la sixième année de vie [RR=1,38 (0,71 à 1,70)], l'association n'étant pas statistiquement significative lorsque tous les cancers étaient considérés [RR=0,96 (0,67 à 1,37)]. Des résultats similaires étaient rapportés par Passmore *et al.* (1998) la même année, les auteurs ayant observé une augmentation du risque aux limites de la significativité (RR=1,44,

$P=0,05$). Soulignons que dans ce dernier cas l'augmentation du risque était principalement dû à un risque accru de leucémie.

Plus récemment, les données individuelles des études de Golding *et al.* (1992), de Von Kries *et al.* (1996), d'Ansell *et al.* (1996), de Passmore *et al.* (1998), de McKinney *et al.* (1998) et de Parker *et al.* (1998) étaient regroupées dans le cadre d'une méta-analyse. Les auteurs ont ainsi comparé 2431 enfants présentant un diagnostic de cancer avant l'âge de 15 ans, à 6338 enfants témoins. Dans l'ensemble, l'analyse n'a pas permis de confirmer une association positive entre l'administration de vitamine K par voie intramusculaire à la naissance et un risque accru de développer un cancer, incluant la leucémie, dans les quinze premières années de vie (Roman, 2002).

À la lumière de ces résultats et considérant l'efficacité de la vitamine K en regard du syndrome hémorragique du nourrisson, la société canadienne de pédiatrie réitérait, en mars 2002, sa confiance dans cette mesure prophylactique (Énoncé de pédiatrie, 2002).

3.2 INTERACTION NÉOPLASIE ET COAGULATION SANGUINE

La possibilité que les phénomènes néoplasiques puissent entraîner des désordres de la coagulation était suggérée il y a plus de 100 ans, lorsqu'en 1872 Trousseau *et al.* décrivaient les premiers cas de thrombophlébite chez des patients

cancéreux. Par la suite, Sproul *et al.* (1938) rapportaient une incidence augmentée de thromboses veineuses chez des patients ayant succombé à un cancer du pancréas. D'autres études rapportaient quant à elles une augmentation de l'incidence de thromboses veineuses et pulmonaires chez des patients décédés à la suite de cancers de natures diverses (Fischer 1951) (Greenberg, 1964) (Lieberman, 1961). Des études visant à élucider les mécanismes par lesquels le processus de néoplasie amplifie les désordres de la coagulation révélaient que les cellules tumorales circulantes possèdent une activité thromboplastique favorisant ou accélérant la formation d'un caillot dans la circulation sanguine (Hauschka, 1986). Plus spécifiquement cette action serait attribuable à la production d'un facteur procoagulant, le « *cancer coagulative factor* » (Colucci, 1981, O'meara 1964)), à l'activation du facteur X (Curatolo, 1979) ou à la production de prothrombinases, enzymes permettant la transformation de la prothrombine en thrombine (Dvorak, 1983).

À l'inverse, la possibilité que les phénomènes néoplasiques puissent découler de désordres de la coagulation a été proposée pour la première fois au début des années cinquante lorsque certains chercheurs ont noté la présence d'épisodes de thrombose précédant le développement de cancers, une observation confirmée dans les années '80 et '90 (Ackerman, 1951) (Wright, 1952). Dans une étude rétrospective réalisée auprès de 128 patients, Gore *et al.* (1982) examinaient l'incidence de cancer avant et après un épisode d'embolie pulmonaire. Alors qu'avant l'embolie l'incidence de cancer était essentiellement comparable à celle d'un groupe témoin (12% vs 10%), elle augmentait dans les deux années suivant l'embolie ; 13 patients

avec embolie ayant développé un cancer contre 0 dans le groupe témoin ($p < 0,001$). De même, dans une étude portant sur 1383 sujets présentant un diagnostic de thromboembolie veineuse et 2412 sujets sains, Noldstrom *et al.* (1994) rapportaient une prévalence de cancer chez 44% des patients ayant subi une thromboembolie contre 20% pour les sujets sains ($p < 0,0001$). L'augmentation du risque de cancer s'observait plus particulièrement durant les six premiers mois suivant le diagnostic, le risque étant identique par la suite. Bien que moins marquée, une tendance similaire était observée dans une étude cohorte comprenant 15 348 personnes ayant subi un épisode de thrombose veineuse et 11 305 personnes un épisode d'embolie pulmonaire. Dans cette étude, les patients qui avaient subi une thrombose veineuse ou une embolie pulmonaire présentaient un risque d'environ 30% plus élevé de développer un cancer au cours de l'année suivante ; thrombose veineuse [RR=1,3 (1,21 à 1,33)] et embolie pulmonaire [RR=1,3 (1,22 à 1,41)] (Sorensen, 1998).

D'autres travaux ont mis en évidence un risque particulièrement élevé de développer un cancer dans le cas de thromboses récurrentes. Dans une étude de Prandoni *et al.* (1992), 250 patients ont été suivis sur une période de deux ans à la suite d'un diagnostic de thrombose veineuse. De ce nombre, 145 patients présentaient un diagnostic de thrombose idiopathique dont 35 se sont avérées récurrentes et 105 patients présentaient un diagnostic de thrombose secondaire. Ainsi, le risque était environ deux fois plus élevé de développer un cancer à la suite d'une thrombose veineuse idiopathique qu'à la suite d'une thrombose secondaire [RR = 2,3 (1,0 à 5,2) ($p = 0,043$)]. Chez les 35 patients dont la thrombose idiopathique était de

nature récurrente, le risque était presque 10 fois plus élevé [RR = 9,8 (1,8 à 52,2)]. Soulignons que dans cette étude, la plupart des cancers étaient diagnostiqués au cours de la première année suivant l'épisode de thrombose.

La relation entre le risque de néoplasie et les désordres de la coagulation a également été étudiée sur des périodes plus longues. Ainsi, les résultats d'une étude de cohorte comportant 61 998 sujets révélaient un risque qui demeurait augmenté à plus long terme. En effet, contrairement aux études de Prandoni *et al.*, de Noldstrom *et al.* et de Sorenson *et al.*, où le risque n'était pas augmenté au-delà des six à douze premiers mois suivant la thrombose, dans cette étude le risque était significativement augmenté (environ 30%) jusqu'à la 25^{ème} année suivant l'embolie. (Baron, 1998).

Les associations observées entre les états d'hypercoagulabilité telles que les thromboembolies et le processus de néoplasie ont tout naturellement incité les chercheurs à se pencher sur l'impact potentiellement bénéfique des anti-vitamine K sur le devenir clinique des patients atteints de cancer. Par exemple, dans une étude prospective de Zacharski *et al.* (1981) l'espérance de vie était évaluée chez 50 patients atteints d'un carcinome pulmonaire dont 25 étaient traités à la warfarine sodique. La survie de ces patients était le double de celle des sujets témoins soit, 50 semaines contre 24 semaines ($p=0,026$). Une grande étude de Schulman *et al.* (2000) (N=854) a plus récemment démontré que cet effet bénéfique de la warfarine sodique était directement relié à la durée du traitement, l'incidence de cancer diminuant de manière inversement proportionnelle à la durée du traitement; les risques de

développer un cancer étaient de 10,3 et de 15,8 % chez ceux traités pour des durées de six mois et six semaines respectivement ($p=0,02$). De plus, les auteurs confirmaient l'augmentation du risque de développer un cancer après un premier épisode de thromboembolie veineuse durant la première [RR=3,4 (2,2 à 4,6)] et la deuxième [RR=1,9 (1,0 à 2,8)] année suivant l'épisode de thrombose, le risque relatif demeurant supérieur à 1 durant les quatre années suivantes, bien que statistiquement non-significatif. Sur la base de ces résultats, les auteurs concluaient à un effet potentiellement antinéoplasique des antagonistes de la vitamine K.

Soulignons toutefois que ces résultats n'ont pas été confirmés dans toutes les cas. Par exemple, dans une étude de Maurer *et al.* (1997) 179 patients atteints d'un carcinome pulmonaire n'ont vu aucune différence dans l'issue de leur maladie, que la warfarine ait été ou non incluse aux traitements contre le cancer.

En somme, la majorité de ces études suggère une augmentation du risque de développer un cancer par suite d'un épisode de thrombose ayant été observée à court et à long terme. Certaines de ces études mettent également en évidence un impact potentiellement positif de la warfarine sur l'évolution de la néoplasie. Les paragraphes qui suivent présentent quelques voies mécanistiques ayant été proposées pour expliquer ce lien.

Un premier de ces mécanisme impliquerait la fibrine, un produit de la coagulation que l'on trouve fréquemment associée aux tumeurs (Mosesson, 2000).

D'après certains auteurs, la fibrine créerait une barrière autour des tumeurs, empêchant les cellules du système immunitaire de les attaquer et de les détruire (Dvorak, 1983 et 1986). Selon des travaux *in vitro*, la fibrine pourrait également favoriser l'angiogenèse, un mécanisme de vascularisation nourrissant la tumeur et lui permettant de croître et de développer des métastases (Olander, 1985).

Par ailleurs, les processus néoplasiques pourraient être favorisés par le biais de la thrombine. Des travaux ont en effet démontré que cette protéine stimule la sécrétion autocrine de divers facteurs de croissance (Hejna, 1999) et, dans certaines circonstances, agit elle-même comme un facteur de croissance (Galdal, 1985) (Bar-Shavit, 1986). La thrombine pourrait aussi contribuer aux processus néoplasiques en stimulant la sécrétion d'une famille d'enzymes, les métalloprotéases, dont le rôle est de dégrader la matrice extracellulaire (Fernandez-Patron, 1999).

Les *matrix metalloproteases* ou MMP forment en effet une famille d'enzymes (protéases) qui se divise en sous-familles selon leur substrat et leur structure. Sur le plan physiologique, ces enzymes sont synthétisées et sécrétées dans diverses cellules et participent à une gamme de processus biologiques normaux nécessitant la dégradation des membranes basales et des tissus conjonctifs. Parmi ces processus on compte l'embryogenèse, le cycle menstruel, la cicatrisation et la réponse inflammatoire (Ellerbroek, 1999). Ces enzymes sont toutes synthétisées sous forme de proenzymes et leur activation comporte plusieurs étapes. Une fois activées, les MMP peuvent être inhibées par des facteurs appelés *Tissue inhibitors of*

metalloproteinases (TIMP) (Nagase, 1997). L'implication des MMP dans les processus néoplasiques est notamment suggérée à la lumière du fait que leur expression se trouve augmentée dans diverses tumeurs humaines et lignées cellulaires cancéreuses (Powell, 1996). Comme ce qui est observé dans les processus physiologiques normaux, l'implication des MMP dans la néoplasie serait liée à son rôle de dégradation de la matrice cellulaire, permettant ainsi l'invasion, la prolifération des cellules tumorales et l'angiogenèse (Afzal, 1998) (Liotta, 1991).

Deux métalloprotéases, la MMP-2 et la MMP-9, ont particulièrement été associées au développement des cancers chez l'humain (Ellerbroek, 1999). La MMP-2 est l'enzyme de la famille des MMP la plus largement distribuée et se retrouve généralement à la surface des cellules (Sato, 1994). Bien que de distribution plus limitée, la MMP-9 a elle aussi été localisée à la surface des cellules (Yu, 1999). L'expression de ces deux protéases a notamment été associée aux processus invasifs dans plusieurs type de néoplasie dont celle du sein (Alessandro, 1993) (Monteago, 1990) (Bourguignon, 1998). Par exemple, Iwata *et al.* (1996) ont démontré que l'expression de la MMP-2 variait proportionnellement en fonction de la taille de la tumeur et de son stade d'évolution. Dans une autre étude, l'activation de cette même enzyme s'est avérée significativement plus importante dans des carcinomes mammaires à nodules lymphatiques ou métastatiques, que dans des carcinomes amétastatiques (Ueno, 1997).

En conclusion, plusieurs mécanismes viennent appuyer une association entre les processus de néoplasie et de la coagulation. Comme nous le verrons à la prochaine section, le rôle de la vitamine K dans le développement des cancers pourrait également être plus directe.

3.3 CYTOTOXICITÉ DE LA VITAMINE K

En raison de sa structure chimique, notamment de la présence de son noyau naphthoquinone, la vitamine K comporte un potentiel cytotoxique qui a incité les chercheurs à vérifier son implication potentielle dans les processus de néoplasie.

Dans une première série d'études réalisée par l'équipe d'Israel, le potentiel cytotoxique de la vitamine K, a été étudié en utilisant un modèle de carcinogenèse, le Benzo[a]pyrène (BP). Tout d'abord, les effets cytotoxiques des vitamères phylloquinone et ménadione ont été comparés chez la souris. L'administration des vitamères à une même concentration, 5mg/kg, chez des animaux traités au BP a induit des effets opposés. En effet, le nombre de tumeurs et le taux de mortalité ont été significativement augmentés par la phylloquinone ($p < 0,05$) tandis qu'ils ont été diminués par la ménadione ($p < 0,05$) (Israels, 1983). Par la suite, l'étude du métabolisme du BP a montré que la phylloquinone induisait une augmentation des métabolites actifs du BP, les phénols, les quinones et les diols. En fait, la phylloquinone agit sur l'activité des enzymes régulant le cycle du BP : l'arylhydrocarbène hydroxylase (AHH), enzyme responsable de la production de ces

métabolites et la glutathione S-transférase (GST) responsable de leur élimination par conjugaison. L'activité de l'AHH, mesurée dans le foie d'embryon de poulet traité au BP, était deux fois plus importante après l'administration de la phylloquinone ($436 \pm 63,7$ versus $233 \pm 37,8$ nmol/g/h ; $p < 0,001$). Dans les mêmes conditions, l'activité de la GST était quant à elle diminuée de 50 % par la phylloquinone (256 ± 36 versus 401 ± 94 nmol/cong/min/mg ; $p < 0,05$) (Israels, 1995). Une augmentation de la production des métabolites du BP par la phylloquinone avait d'ailleurs déjà été démontrée par l'équipe d'Israel dans des microsomes hépatiques de souris (Israels, 1985). Quelques années plus tard, cette même équipe, associait des doses élevées de vitamine K à des changements au niveau de l'ADN. Dans une étude *in vitro*, réalisée sur des lymphocytes d'origine humaine et animale, l'addition de phylloquinone a entraîné une augmentation des *Échanges de Chromatides-Sœurs* (ECS), un marqueur classique de l'activité mutagénique. Ces résultats ont par ailleurs été confirmés *in vivo* chez l'animal. En effet, l'injection de 1 mg de phylloquinone à cinq fœtus de mouton, soit l'équivalent de la dose prophylactique administrée chez le nouveau-né, a été associé à une augmentation significative des ECS dans les leucocytes ; $3,94 \pm 0,15$ ECS par métaphase pré-injection et $5,38 \pm 0,23$ post-injection ($p < 0,01$) (Israels 1987).

Les effets cytotoxiques de la phylloquinone observés par l'équipe d'Israel, n'ont pas été confirmés par la suite. Dans une étude de Cornelissen *et al.* (1991), les taux de ECS et d'*Aberrations Chromosomiques* (AC) de lymphocytes ont été dosés chez 12 nouveau-nés. Six d'entre eux ont reçu 1 mg de phylloquinone intramusculaire et les six autres n'ont reçu aucun traitement. Malgré une

augmentation de 5000 fois des taux de vitamine K plasmatique dans le groupe traité, aucune différence significative au niveau des ECS et des AC n'a été observée entre les deux groupes. En effet, le nombre de ECS par métaphase et de AC par 100 mitoses était respectivement de $8,9 \pm 1,2$ et $3,0 \pm 2,6$ chez les enfants traités à la vitamine K et de $9,1 \pm 1,1$ et $2,5 \pm 1,9$ chez les témoins (NS). L'innocuité de la phylloquinone chez l'enfant a par ailleurs été confirmée à l'aide d'un autre marqueur de l'activité mutagénique, la mutation glycophorine A (GPA). L'administration de vitamine K chez des nouveau-nés, n'a pas entraîné d'augmentation de mutation GPA comparativement à une population de référence d'enfants âgés de 1 à 15 ans. Au contraire, les cellules souches érythrocytaires des enfants traités à la phylloquinone, indépendamment de la voie d'administration, soit la voie orale (n=64), la voie intramusculaire (n=17) ou la voie intraveineuse (n=25), ont présenté significativement moins de mutations GPA que celles de la population de référence ($P < 0,01$) (Pizer, 1995).

Le potentiel cytotoxique de la forme synthétique de la vitamine K semble par ailleurs plus important que celui de la phylloquinone. En effet, D'odorico *et al.* (1997) ont montré que seule la forme synthétique de la vitamine, la ménadione affectait l'intégrité de l'ADN d'une lignée cellulaire cancéreuse. Les formes naturelles de la vitamine, la phylloquinone et les ménaquinones, n'ont entraîné aucun dommage à l'ADN tandis que la ménadione a été associée à des bris des brins de l'ADN en fonction de la dose (corrélation linéaire $r = 0,95$). Les travaux de Nishikawa *et al.* (1995) ont aussi montré une plus grande cytotoxicité de la

ménadione tant vis à vis des cellules cancéreuses que des cellules normales. Les ménaquinones, quant à elles, possédaient une cytotoxicité beaucoup moins grande et surtout plus spécifique aux cellules cancéreuses, tandis que la phylloquinone ne démontrait aucune cytotoxicité. Ainsi, la dose requise pour détruire 50% des cellules à l'état de confluence (CC_{50}) était supérieure à 1000 μ M pour la phylloquinone, de 112 μ M pour la ménaquinone et de 10 μ M pour la ménadione. Concernant les ménaquinones, Ishihara *et al.* (2000) démontraient que leur potentiel cytotoxique était inversement proportionnel à la longueur de la chaîne isoprénique. En effet, la CC_{50} de la MK-1, la MK-2 et la MK-3 variait entre 100 et 400 μ M tandis que celles des MK-4, MK-5 et MK-6 était supérieure à 1000 μ M.

L'action cytotoxique de la vitamine K a été étudiée de manière plus spécifique en regard de la production de radicaux libres. Il a été observé que l'activité cytotoxique de la ménadione proviendrait d'un pouvoir oxydatif. En effet, en conditions alcalines, la forme synthétique de la vitamine a généré des radicaux libres et a augmenté de façon marquée l'intensité radicalaire de l'ascorbate en fonction de la concentration; l'intensité étant égale à 114% pour 0,001 mM et à 525% pour 10 mM (Okayasu, 2001). L'activité cytotoxique des ménaquinones, plus faible que celle de la ménadione, ne semble par contre pas être attribuable à un pouvoir oxydatif. Des travaux ont démontré que les ménaquinones en conditions alcalines ne produisaient aucun radical libre et augmentaient très faiblement l'intensité radicalaire de l'ascorbate (Okayasu, 2001) (Ishihara, 2000). Récemment, un effet apoptotique de la MK-4 et impliquant une synthèse protéique de novo, a été décrit dans deux lignées

cellulaires cancéreuses. Ainsi, l'activité cytotoxique de la MK-4 n'impliquerait pas les mécanismes oxydatifs (Shibayama-Imazu, 2003).

Dans l'ensemble, ces travaux ont démontré un potentiel cytotoxique de la vitamine K pouvant contribuer aux processus néoplasiques. Cependant, cette toxicité varie en fonction de la forme de la vitamine. Sur la base des travaux récents, la phylloquinone semble peu toxique contrairement à la ménadione, qui elle possède un potentiel cytotoxique non-négligeable.

3.4 RÔLE NÉOPLASIQUE VIA LA PROTÉINE GAS6

Un autre mécanisme par lequel la vitamine K pourrait être impliquée dans le processus néoplasique est par la voie de la protéine Gas6. Comme nous l'avons vu à la section 2.2.4, la protéine Gas6 est un ligand privilégié des récepteurs tyrosine kinase Axl (Ufo/Ark), Sky (Dtk/Tyro3/Rse/Brk/Tif) et Mer (Eyk/Nyk) impliqués dans une gamme d'évènements cellulaires incluant la prolifération, la différenciation et la survie. Or, il existe de l'évidence à l'effet que l'expression de plusieurs de ces récepteurs soit modifiée dans des états de néoplasie. Par exemple, une sur-expression du récepteur Mer a été associée à l'apparition de tumeurs malignes lymphoïdes (Chen 1997), celle du récepteur Axl aux cancers du côlon et du sein (Goruppi 2001) et celle du récepteur Sky aux carcinomes œsophagiens (Saxena 1997). D'autre part, une étude de Goruppi *et al.* confirmait l'implication de Gas6 dans le développement et la progression de tumeurs mammaires. En effet, l'addition de Gas6 dans une culture de

cellules mammaires de souris a induit la croissance de ces cellules après l'état de confluence (Goruppi, 2001). L'implication de la vitamine K dans ces processus a été cependant peu étudiée, une étude a mis en évidence une augmentation de l'activité des récepteurs de la tyrosine kinase en présence de la phylloquinone. En effet, lorsqu'étudié dans des embryons de poulet, le taux de phosphorylation de ces récepteurs a été multiplié par trois dans le cerveau et dans le foie (Saxena, 2001).

En conclusion, la vitamine K pourrait être impliquée dans les processus néoplasiques par le biais de trois mécanismes. D'abord, par son rôle dans la coagulation sanguine ensuite, par sa nature potentiellement cytotoxique puis finalement, via la protéine gas6. Si les études réalisées à ce jour constituent un bon point de départ, peu d'entre-elles ont toutefois été effectuées dans un contexte physiologique. Il est ainsi difficile d'extrapoler ces résultats au domaine de la nutrition. De ce fait, il apparaît nécessaire de déterminer si la phylloquinone, consommée à des quantités physiologiques, influence ou non les processus néoplasiques. L'effet potentiellement néoplasique de la vitamine a donc été étudié dans un modèle de carcinogénèse chez des rats ayant reçus une diète adéquate ou élevée en phylloquinone.

4. Hypothèse de recherche et objectifs de l'étude

4.1 FORMULATION DE L'HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

La vitamine K influence le processus de tumorigénèse mammaire chez le rat.

4.2 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Les principaux objectifs de cette étude sont les suivants :

1. Évaluer l'impact d'une diète enrichie en phylloquinone sur l'incidence de tumeurs mammaires chez des rats traités avec un carcinogène, le diméthylbenzo(a)entracène (DMBA).
2. Déterminer s'il existe une relation entre l'apport en phylloquinone, le traitement au carcinogène (DMBA) et :
 - L'apparition de marqueurs plasmatiques de l'oxydation lipidique
 - Le système antioxydatif plasmatique GSH/GSSG
 - L'expression de deux MMP dans différents tissus.
 - L'expression de la protéine gas6 dans différents tissus.

Figure A : Structure de la vitamine K

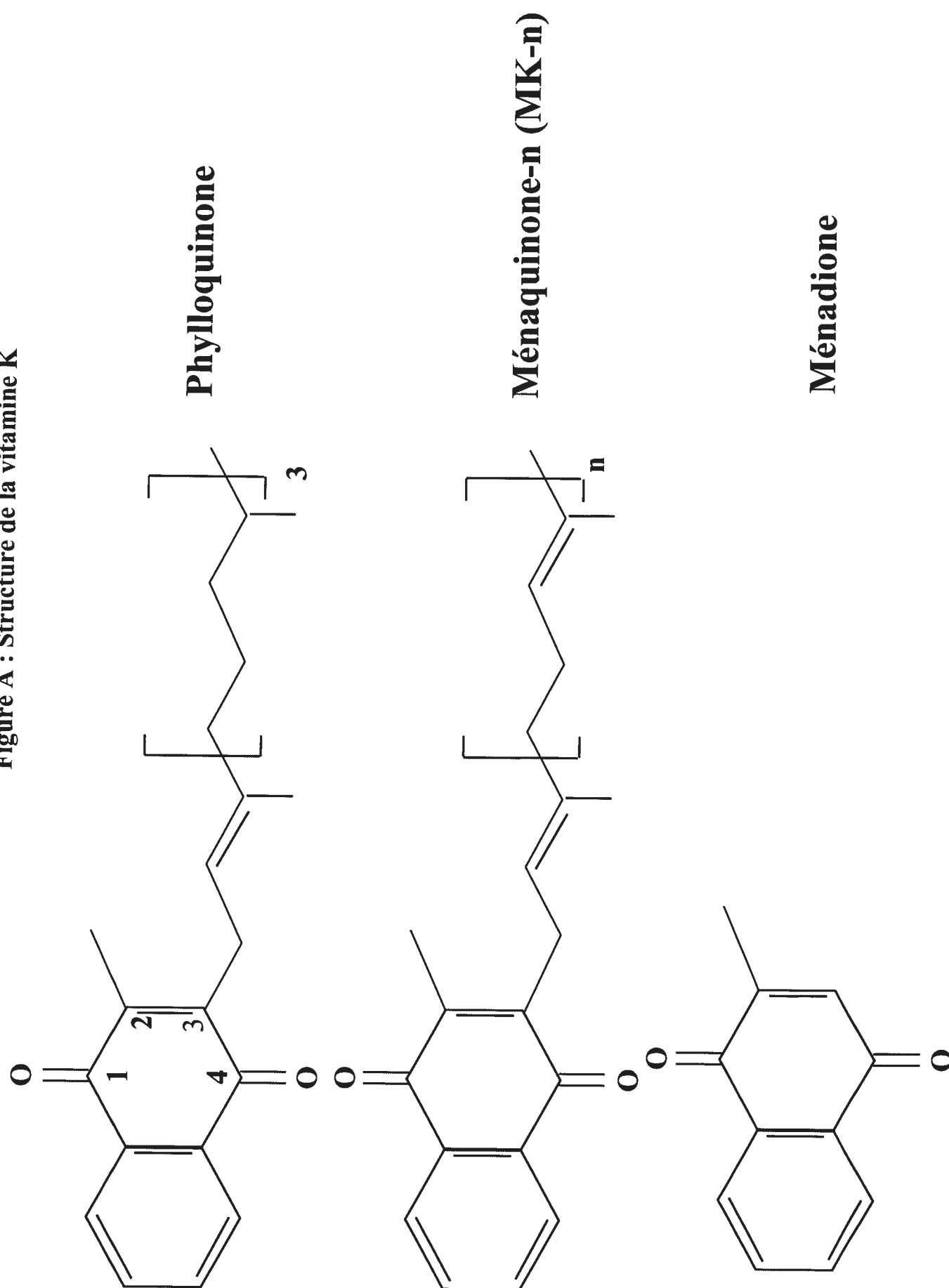
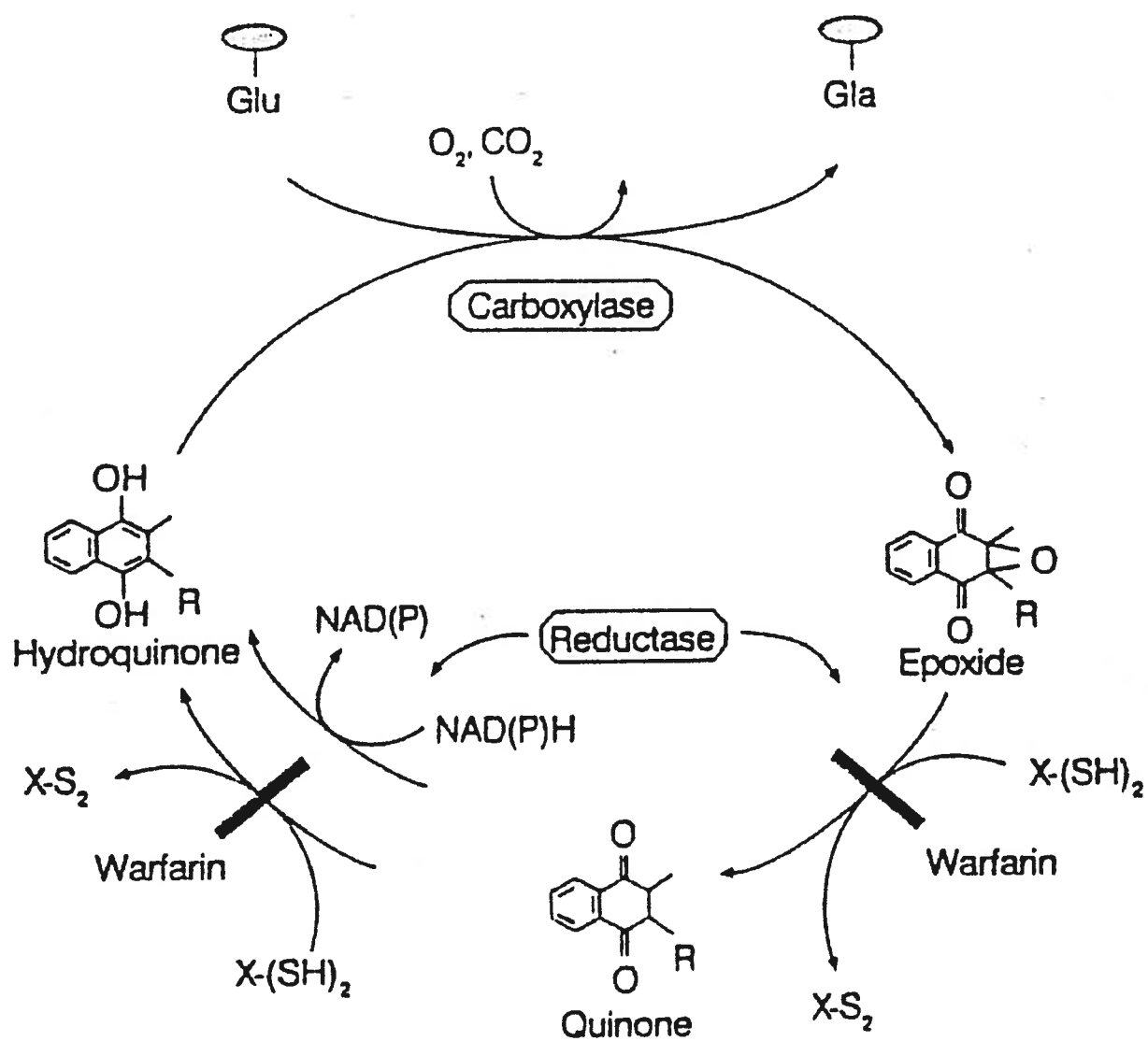


Figure B : Cycle de la vitamine K



III. ARTICLE

High vitamin K intake associated with lower mammary tumour incidence in DMBA-treated rats.

Potvin S¹, Carrié I¹, Vicaretti R¹ and Ferland G^{1,2}

¹ Département de Nutrition, Faculté de médecine, Université de Montréal, H3C3J7
Montréal, Canada

² To whom correspondence should be addressed
E-mail: Guylaine.Ferland@umontreal.ca

Financial support was provided by NSERC and FRSQ

Abbreviations: VK, GLA, Gas6, GSH, GSSH, DMBA, E, A, MK-4, BP, DNA.

Key words: Vitamin K, phylloquinone, mammary tumours, DMBA, lipid peroxidation antioxidant

ABSTRACT

Recent studies have suggested that vitamin K could play a role in tumour growth and may potentially amplify carcinogenic events. To study this relationship more directly we assessed the effect of dietary vitamin K intake on mammary tumour burden and incidence in the rat using a carcinogen-induced tumour model. Female Sprague-Dawley rats fed adequate (A) (n=30) or enriched (E) (n=30) vitamin K diets and half of them were treated with dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). After 20 weeks of treatment rats were sacrificed and tumour incidence and burden were assessed. Vitamin K content in key organs (spleen, liver, ovaries, tumours) was determined as control of the dietary regimen. We also determined the oxidative stress by assessing the degree of conjugated dienes and hydroperoxides and evaluated the levels of antioxidant by dosing GSH and its oxidised form, GSSG in plasma. Significantly higher tissue vitamin K content was found in the E group vs the A group ($p < 0.05$). Higher vitamin K intake was associated with lower mammary tumour incidence [43% for the A group versus 29% for the E group (n.s.)]. Tumour burden was also higher in the A vs E group (11 vs 4 tumours total). Marker of lipid peroxidation was not related to tumour outcome. However, the lower tumour incidence of animals maintained on an enriched vitamin K diet could be related to an upregulation of the GSH/GSSG antioxidant process. In conclusion, results from this study suggest that vitamin K may offer some protection against mammary neoplasia when consumed in slightly higher amounts than recommended. These findings should be confirmed in other experimental models.

INTRODUCTION

One of the lipid soluble vitamins, vitamin K was historically discovered for its role in blood coagulation and the hepatic synthesis of proteins regulating this process (prothrombin, factors VII, IX, X, proteins C, S and Z) (1). At the molecular level, vitamin K acts as a co-factor in a carboxylation reaction that transforms glutamic acid residues contained in proteins into gamma-carboxyglutamic acid (Gla) (2). It is now known that the action of vitamin K is not limited to the hemostatic system however but includes proteins involved in bone, calcium metabolism, and cell proliferation (3). The essentiality of dietary vitamin K for the maintenance of adequate nutritional state has been demonstrated in humans and animal species. Although vitamin K is not formally associated to any forms of toxicity (4), some reports have linked vitamin K to neoplastic processes. In a series of *in vivo* and *in vitro* studies, the presence of high concentrations of vitamin K was associated with increased sister-chromatid exchanges in lymphocytes and decreased activity of glutathione transferase (5). In the early nineties, vitamin K was linked to childhood cancer when Golding et al. (6,7) reported that children having received vitamin K intramuscularly at birth had an increased risk (odds ratio: 1.97 to 2.6) of leukemia and other forms of cancer. However subsequent studies conducted in the United States and European countries (8-12) failed to confirm Golding's findings.

In contrast, it has also been suggested that vitamin K could act as an antioxidant. Independent research teams have indeed shown that the reduced form of vitamin K, hydroquinone KH_2 , has potent anti-lipid peroxidation activity in solution (13) and in

microsomes (14). More recently, vitamin K in the form of phylloquinone and menaquinone-4 was reported to potently inhibit glutathione depletion-mediated oxidative cell death in primary cultures of oligodendrocyte precursors and immature fetal cortical neurons (15).

In sum, the role of vitamin K in oxidative stress and neoplasia remains a subject of debate. To gain insight on the action of the vitamin in this regard, we investigated mammary tumorigenesis as a function of vitamin K intake, in 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) treated rats, a well established model of mammary tumorigenesis. The vitamin K - mammary tumorigenesis relationship was further studied in relation to various parameters of lipid peroxidation (productions conjugated dienes and hydroperoxides) and the GSH/GSSG antioxidative system.

MATERIALS AND METHODS

Animals and treatment

The study was conducted at Université de Montréal and was approved by the Animal Care Committee in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Four weeks old female Sprague-Dawley rats ($n = 60$) weighing 50-70 g were purchased from Charles Rivers Canada Inc. (St Constant, Qc). Animals were housed in groups of three in suspended stainless steel wire-bottom cages in a room kept at 22°C with a 12-hour light-dark cycle. All animals had free access to water and food. After one week of acclimatization with Standard Rodent Chow, rats were randomly allocated to a diet containing 500 µg of vitamin K /kg diet [Adequate (A)] ($n=30$) or 2000 µg of vitamin K /kg diet [Enriched (E)] ($n = 30$)(Sigma Chemicals, St Louis, USA); vitamin K was in the form of phylloquinone. Diets were prepared in the laboratory (**table 1**), vitamin K contents of A and E diets were evaluated by HPLC (Means \pm SEM, $n = 8$) and were 513.5 ± 15.0 and 2022.26 ± 59.9 µg respectively. Food intake and body weights were recorded once a week.

At 55 days of age, half the rats ($n = 15$) from each diet group received, by gavage, a single dose (5 mg/100g body wt) of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) (Sigma Chemical Company, Oakville, Ontario), dissolved in corn oil made to a final concentration of 5 mg / ml; DMBA. The rest of the rats received plain corn oil. Rats from each dietary group were inspected weekly for the appearance of palpable tumours. The experiment was terminated 20 weeks post treatment.

On the day of sacrifice, rats were anaesthetised with pentobarbital and bled from the abdominal aorta. Hearts, livers, spleens, ovaries and tumours were quickly removed and gross examination was conducted on all organs. Tissue samples were frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -70°C until analysis. Tumours were assessed for dimensions using a calliper and weights. Samples of tumour tissue were harvested and fixed in 10% buffered formalin for histopathological analyses.

Vitamin K analysis

Phylloquinone and menaquinone-4 were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO). Solvents used in tissue extraction and chromatography were purchased from Fischer Scientific Canada (Nepean, ON) and were HPLC grade. Working standards were prepared in HPLC-grade methanol and were characterized spectrophotometrically and chromatographically before use. All standards were stored at 4°C and protected from light. All operations were performed under yellow lighting and all glassware was washed in a solution of chromic and sulphuric acid. Each tissue sample was weighed and pulverized with a mortar and pestle in anhydrous Na_2SO_4 (10 times tissue weight). The powder was then transferred to a teflon-lined screw-capped glass tube and an internal standard consisting of 2.2 pmol/50 μL dihydro-phyloquinone (K_1H_2 ; a gift from the Vitamin K laboratory, Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, Boston) was added followed by 10 mL of acetone. The mixture was extracted for one hour using a horizontal shaker. After centrifugation ($500\times g$ at 4°C for 10 min), the acetone layer was removed and dried under nitrogen at 45°C . The solid

residue was reextracted with 6 mL of hexane and 2 mL of water by shaking vigorously for 3 min. The layers were separated by centrifugation and the hexane layer was removed and dried under nitrogen. The residue was then redissolved in 2 mL of hexane for solid phase extraction (SPE). For SPE, 3-mL silica gel columns (JT Baker Inc., Phillipsburg, NJ) were preconditioned by washing with 8 mL of hexane-diethyl ether (97:3, v/v) followed by 8 mL of hexane. The 2 mL hexane extract was applied and washed with 8 mL of hexane. The phyloquinone and menaquinone-4 fraction was eluted with 8 mL of hexane-diethyl ether (97:3, v/v). After evaporation under nitrogen, the residue was dissolved in 0.02 mL of dimethyl chloride and 0.180 mL methanol containing aqueous phase (10mmol/L zinc chloride, 10 mmol/L acetic acid and 5 mmol/L sodium acetate; 5mL aqueous phase was added to 1 L methanol).

The chromatographic system consisted of a model 717 automated sample injector (Waters, Mississauga, ON), model 600E pump (Waters) and model L-7480 fluorescence detector (Hitachi). The analytical column (150 x 4.6 mm) was packed with 3 μ m ODS-Hypersil column (Keystone Scientific, Belfonte, PA). Fluorescent derivatives of the injected quinones were produced after separation on the analytical column using a post-column, solid-phase reactor (2.0 x 50 mm) packed with zinc powder (100 mesh, Alpha Aesar, Wardhill, MA). 20 to 50 μ L samples were then injected into the chromatography system and eluted with 94.5% methanol, 5% methylene chloride, 0.5% aqueous phase. The calibration standard consisted of a mixture of phyloquinone, Menaquinone-4 and K_1H_2 at 2.2 pmol/50 mL. The percent recovery for the samples was calculated from the

internal standard and found to be 75-90%. Millenium software (Waters) was used for integration and quantification.

Measurement of plasma lipid peroxydation products

Conjugated diene formation. Plasma samples were previously diluted 1/100 in 10^{-2} M phosphate buffer. The conjugated dienes were measured by differential absorbance spectra of samples between 200 and 700 nm on a Hitachi U-300 spectrophotometer as discribed by Khalil et al. (16). An increase in the differential absorbance at 234 nm corresponds to the formation of conjugated diene, $\epsilon_{234} = 27\,000\text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ (17).

Lipid hydroperoxide formation. Plasma lipid hydroperoxide contents was detected according to the method of el-Saadani et al (18). The assay is based on the oxidative capacity of lipid peroxides to convert iodide to iodine, which can be measured spectrophotometrically at 365 nm. The amount of lipid peroxide is calculated using the extinction coefficient of $\epsilon = 2.46 \times 10^4\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. The working reagent consists of 200 mM monobasic potassium phosphate (pH 6.2), 120 mM potassium iodine, 0.15 mM sodium azide (Fisher Scientific, Montréal, QC, Canada), Triton X-100 (2.0 g/liter), benzalkonium chloride (0.1 g/liter), 0.01 mM ammonium molybdate, 0.02 mM butylated hydroxy toluene (BHT), and 0.024 mM ethyleneglycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) (Sigma, St.Louis, MO). To detect lipid hydroperoxides formed, sample (plasma, 100 μl) was added to 1ml of working reagent and incubated in the dark at room temperature for 30 min. The absorbance was then measured using a U-300 spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan) at 365 nm.

Measurement of plasma antioxidant

We measured GSH and its oxydized form, GSSG in plasma by HPLC according to Lenton et al. (19) Samples were treated with perchloric acid (12%) to precipitate proteins and to avoid GSH oxydation. The final pH of these solutions was maintained below pH 7 and samples were kept at low temperature so as not to induce autooxydation or enzymatic degradation of glutathione. For glutathione disulfide measurements, the final solution was 200 mM phosphate (pH 4.5) with 0.1 mM EDTA and 1 mM NEM. After precipitation, samples were centrifuged at 12,000g for 10 min at 4°C and 25 µl of the supernatant were injected into the HPLC system (W6000; Waters Associated, Milford, MA). The fluorescence was monitored with a Shimadzu RF-551 fluorescence HPLC monitor with an excitation wavelength of 340 nm and an emission wavelength of 425 nm. Samples were analyzed and then compared to standards.

Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm SEM. Tissue vitamin K contents were analysed according to diet by a t-test (Sigmastat Software, version 2.0, SPSS Inc, Chicago, IL). Tumour incidence was analysed by a chi-square test and total number of tumours by a z-test. Differences in the number of tumours/rat and the number of tumours/tumour-bearing rat were determined by t-test. Differences in lipid peroxidation products (conjugated dienes and hydroperoxides) and in antioxidant status (GSH-GSSG) were analysed by two-way ANOVA (Sigmastat Software, version 2.0, SPSS Inc, Chicago, IL). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Food intake and body weight

Average weekly food consumption was 116g/rat and phylloquinone intakes were 58 µg and 232 µg phylloquinone/week in the A and E groups, respectively. Total body weight did not differ significantly between groups throughout the study (**Figure 1**).

Vitamin K concentrations in tissue organs and tumours

Total vitamin K (phylloquinone and MK-4) concentrations in spleen, liver, ovary and heart in the 4 study groups are presented in **table 2**. In group A, vitamin K in the ovary was approximately 2 fold higher than in spleen, liver and heart. There was a significant effect of diet on total vitamin K ($p < 0.05$), concentrations increasing as a function of dietary phylloquinone in all organs. Treatment with DMBA had no significant impact on total organ vitamin K content. Vitamin K concentration in tumours (**Table 2**) varied greatly, ranging between 225-1450 pmol/g and 775-2600 pmol/g in the A and E groups respectively. As for tissue organs, vitamin K content of tumours tended to increase with dietary intake.

Tumour outcome

Two animals, one in each group, died after DMBA administration. No other animal died before autopsy. Necropsy did not reveal metastasis in any of the animals. **Table 3** presents the tumour outcome for each group. None of the rats from the control group (no DMBA treatment) developed tumours. Six of the 14 rats (43%) from the A and four of the 14 rats (29%) from the E group developed mammary tumours at week 20, a

difference that was not statistically significant. However, total number of tumours was significantly higher in the A than in the E group, with 11 and 4 tumours respectively ($p=0.031$). Tumour burden, as determined by the total number of tumours per rat and the number of tumours per tumour-bearing rat was ~2-fold higher in the A than the E group, but the difference did not reach statistical significance. Time of appearance of palpable tumour is illustrated in **Figure 2**. Tumour latency was similar in both group, the first tumour appearing at week 7 in the A group and at week 6 in the E group. These tumours were characterized histologically and were identified as mammary fibroadenoma.

Plasma lipid peroxidation products

As illustrated in **Table 4**, the level of conjugated dienes in plasma was not affected by DMBA treatment within each dietary group, but increased significantly with vitamin K intake. In contrast, plasma hydroperoxides concentrations, a marker of lipid peroxidation, was neither affected by DMBA treatment nor diet.

Glutathione antioxidant system

Concentration for the reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione and their relative ratios (GSH/GSSG) are presented in **Table 5**. Plasma GSH concentration was found to increase with DMBA treatment and with phylloquinone supplementation when present alone. Interestingly, the combined presence of the carcinogen and the high phylloquinone diet had no impact on the level of GSH when compared to the control group but was associated with a significant increase in the GSSG form (oxidized form).

DISCUSSION

The present study was designed to examine the effect physiological levels of vitamin K on mammary tumorigenesis in a carcinogenic model. The role of this vitamin in carcinogenic events had been studied mostly at pharmacological doses in animals or in in vitro models.

Levels of total vitamin K increased as a function of phylloquinone intake in all key organs and menaquinone-4 was the predominant form of vitamin K, except in the liver (data not shown) confirming earlier reports (20-22). Administration of a single dose of DMBA at 5mg per 100g body weight resulted in an incidence of 45% of tumors in the control group, a finding in accordance with that found in the literature (23-25).

Tumour incidence and tumour burden tended to be lower in treated rats fed the enriched phylloquinone diet (E group) than in those fed the A diet. These results disagree with those published earlier by Israels et al. where it was reported that mice treated with benzo(a)pyrene (BP), developed tumors at a significantly slower rate when maintained on a deficient phylloquinone diet than animals maintained on a normal diet. In a second study conducted by this group, animals treated with phylloquinone by intraperitoneal injection, in conjunction with BP, showed earlier tumor appearance and a greater rate of tumor-related death than in the group treated with BP alone (26). Discrepancy between our results and those from Israel's group may be due to the different experimental designs which differed both in terms of rodent species (rat vs mouse) used, vitamin K and carcinogen doses used (DMBA vs BP).

Israels' group also studied the mutagenic and cytotoxic potential and found, using different experimental conditions, phylloquinone to be associated with various markers of DNA damage (sister chromatid exchange, DNA anomaly) (27). It should be noted however that a mutagenic action of vitamin K was not confirmed when investigated in rat embryos cells (28), in a human colon carcinoma cell line (29) or in newborn blood (30,31).

In the present study, we investigated the action of phylloquinone in relation to various markers of oxidative stress. More specifically, we studied two well known markers of lipid peroxidation namely plasma conjugated dienes and hydroperoxides (32) as well as the glutathione antioxidant system (33). Our data showed that the level of plasma conjugated dienes was affected by phylloquinone intake while that of plasma lipid hydroperoxides was not.

However, results observed for the reduced/oxidized forms of glutathione were most interesting. While plasma GSH concentration was found to increase with DMBA treatment and with phylloquinone supplementation when present alone, the combined presence of the carcinogen and the high phylloquinone diet had no impact on the level of GSH but was associated with a significant increase in the the GSSG suggesting an upregulation of the GSH/GSSG antioxidant process. These results are in line with previous report that suggested that vitamin K may act as a potent antioxidant (14,15,35).

In conclusion, results from this study suggest that vitamin K may offer some protection against mammary neoplasia when consumed in slightly higher amounts than

recommended and suggest that this protection may be related to the glutathione antioxidant system. These findings should be confirmed in other experimental models.

REFERENCES

1. Suttie, J. W. (1985) Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem* 54: 459-477.
2. Shearer, M. J. (1990) Vitamin K and vitamin K-dependent proteins. *Br J Haematol* 75: 156-162.
3. Ferland, G. (1998) The vitamin K-dependent proteins: an update. *Nutr Rev* 56: 223-230.
4. Trumbo, P., Yates, A. A., Schlicker, S., & Poos, M. (2001) Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc* 101: 294-301.
5. Israels, L. G., & Israels, E. D. (1995) Observations on vitamin K deficiency in the fetus and newborn: has nature made a mistake? *Semin Thromb Hemost* 21: 357-363.
6. Golding, J., Paterson, M., & Kinley, L.J. (1990) Factors associated with childhood cancer in a national cohort study. *Br J Cancer* 62: 304-308.
7. Golding, J., Greenwood, R., Birmingham, K., & Mott, M. (1992) Childhood cancer, intramuscular vitamin K, and pethidine given during labour. *Bmj* 305: 341-346.
8. Ansell, P., Bull, D., & Roman, E. (1996) Childhood leukaemia and intramuscular vitamin K: findings from a case-control study. *Bmj* 313: 204-205.
9. Ekelund, H., Finnstrom, O., Gunnarskog, J., Kallen, B., & Larsson, Y. (1993) Administration of vitamin K to newborn infants and childhood cancer. *Bmj* 307: 89-91.
10. Klebanoff, M. A., Read, J. S., Mills, J. L., & Shiono, P. H. (1993) The risk of childhood cancer after neonatal exposure to vitamin K. *N Engl J Med* 329: 905-908.
11. Olsen, J. H., Hertz, H., Blinkenberg, K., & Verder, H. (1994) Vitamin K regimens and incidence of childhood cancer in Denmark. *Bmj* 308: 895-896.
12. von Kries, R., Gobel, U., Hachmeister, A., Kaletsch, U., & Michaelis, J. (1996) Vitamin K and childhood cancer: a population based case-control study in Lower Saxony, Germany. *Bmj* 313: 199-203.

13. Mukai, K., Morimoto, H., Kikuchi, S., & Nagaoka, S. (1993) Kinetic study of free-radical-scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K and tocopherol quinone) in solution. *Biochim Biophys Acta* 1157: 313-317.
14. Vervoort, L. M., Ronden, J. E., & Thijssen, H. H. (1997) The potent antioxidant activity of the vitamin K cycle in microsomal lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 54: 871-876.
15. Li, J., Lin, J.C., Wang, H., Peterson, J.W., Furie, B.C., Furie, B., Booth, S.L., Volpe, J.J., & Rosenberg, P.A. (2003) Novel role of vitamin k in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons. *J Neurosci* 23: 5816-5826.
16. Khalil, A., Wagner, J.R., Lacombe, G., Dangoisse, V., Fulop, T. (1996) Increased susceptibility of low-density lipoprotein (LDL) to oxidation by gamma-radiolysis with age. *FEBS Lett* 392: 45-48.
17. Pryor, W.A., & Castle, L. (1984) Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. *Methods Enzymol* 105: 293-299.
18. el-Saadani, M., Esterbauer, H., el-Sayed, M., Goher, M., Nassar, A.Y., & Jurgens, G.(1989) A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *J Lipid Res* 30: 627-630.
19. Lenton, K.J., Therriault, H., & Wagner, J.R. (1999) Analysis of glutathione and glutathione disulfide in whole cells and mitochondria by postcolumn derivatization high-performance liquid chromatography with ortho-phthalaldehyde. *Anal Biochem* 274: 125-130.
20. Thijssen, H. H., Drikkij-Reijnders, M. J., & Fischer, M. A. (1996) Phylloquinone and menaquinone-4 distribution in rats: synthesis rather than uptake determines menaquinone-4 organ concentrations. *J Nutr* 126: 537-543.
21. Ferland, G., Mainville, D. & Doucet, I. (1997) Vitamin K₁ (VK₁) and menaquinone-4 tissue distribution in 3, 12 and 22 month old male and female rats fed a low, adequate or high VK₁ diet. *FASEB J* 11: A192.
22. Ronden, J.E., Thijssen, H.H.W. & Vermeer, C. (1998) Tissue distribution of K-vitamins under different nutritional regimens in the rat. *Biochem Biophys Acta* 1379: 16-22.
23. Zusman, I., Gurevich, P., Madar, Z., Nyska, A., Korol, D., Timar, B., & Zuckerman, A. (1997) Tumor-promoting and tumor-protective effects of high-fat diets on chemically induced mammary cancer in rats. *Anticancer Res* 17: 349-56.

24. Minami, M., & Noguchi, M. (1996) Effects of low-dose eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid and dietary fat on the incidence, growth and cell kinetics of mammary carcinomas in rats. *Oncology* 53: 398-405.
25. Ekstrom, T., Mild, K.H., & Holmberg, B. (1998) Mammary tumours in Sprague-Dawley rats after initiation with DMBA followed by exposure to 50 Hz electromagnetic fields in a promotional scheme. *Cancer Lett* 123: 107-11.
26. Israels, L. G., Walls, G. A., Ollmann, D. J., Friesen, E., & Israels, E. D. (1983) Vitamin K as a regulator of benzo(a)pyrene metabolism, mutagenesis, and carcinogenesis. Studies with rat microsomes and tumorigenesis in mice. *J Clin Invest* 71: 1130-1140.
27. Israels, L. G., Friesen, E., Jansen, A. H., & Israels, E. D. (1987) Vitamin K1 increases sister chromatid exchange in vitro in human leukocytes and in vivo in fetal sheep cells: a possible role for "vitamin K deficiency" in the fetus. *Pediatr Res* 22: 405-408.
28. Webster, W. S., Vaghef, H., Ryan, B., Dencker, L., & Hellman, B. (2000) Measurement of DNA damage by the comet assay in rat embryos grown in media containing high concentrations of vitamin K(1). *Toxicol In Vitro* 14: 95-99.
29. D'Odorico, A., Sturniolo, G. C., Bilton, R. F., Morris, A. I., Gilmore, I. T., & Naccarato, R. (1997) Quinone-induced DNA single strand breaks in a human colon carcinoma cell line. *Carcinogenesis* 18: 43-46.
30. Pizer, B., Boyse, J., Hunt, L., & Mott, M. (1995) Neonatal vitamin K administration and in vivo somatic mutation. *Mutat Res* 347: 135-139.
31. Cornelissen, M., Smeets, D., Merckx, G., De Abreu, R., Kollee, L., & Monnens, L. (1991) Analysis of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral blood lymphocytes of newborns after vitamin K prophylaxis at birth. *Pediatr Res* 30: 550-553.
32. Favier A. (1997) Oxidative stress: value of its demonstration in medical biology and problems posed by the choice of a marker. *Ann Biol Clin* 55 :9-16.
33. Dickinson, D.A., & Forman, H.J. (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64: 1019-1026.
34. Canfield, L. M., Davy, L. A., & Thomas, G. L. (1985) Anti-oxidant/pro-oxidant reactions of vitamin K. *Biochem Biophys Res Commun* 128: 211-219.

Table 1 : Diet Composition (g/kg)

Casein (Vitamin free)	220
Sucrose	485
Corn Starch	150
Cellulose	46
Corn oil	50
AIN-76 Mineral Mix ¹	35
DL methionine	3
AIN-76 Vitamin Mix without Vitamin K ²	10

1 Composition of the mineral mixture (g/kg) from ICN Biomedicals Canada :

Calcium Phosphate Dibasic, 500; Sodium Chloride, 74; Potassium Citrate Monohydrate, 220; Potassium Sulfate, 52; Magnesium Oxide, 24; Manganese Carbonate, 3.5; Ferric Citrate, 6; Zinc Carbonate, 1.6; Cupric carbonate, 0.3; Potassium Iodate, 0.01; Sodium Selenite, 0.01; Chromium Potassium Sulfate, 0.55; Sucrose, 118.

2 Composition of vitamin mixture (g/kg) from ICN Biomedicals Canada :

Thiamine hydrochloride, 0.6; Riboflavin, 0.6; Pyridoxine hydrochloride, 0.7; Nicotinic acid, 3; D-Calcium pantothenate, 1.6; Folic acid, 0.2; ; D-Biotin, 0.02; Cyanocobalamin, 0.001; Retinyl palmitate, 1.6; DL-alpha-Tocopherol acetate, 20; Cholecalciferol, 0.25, Sucrose, 973.

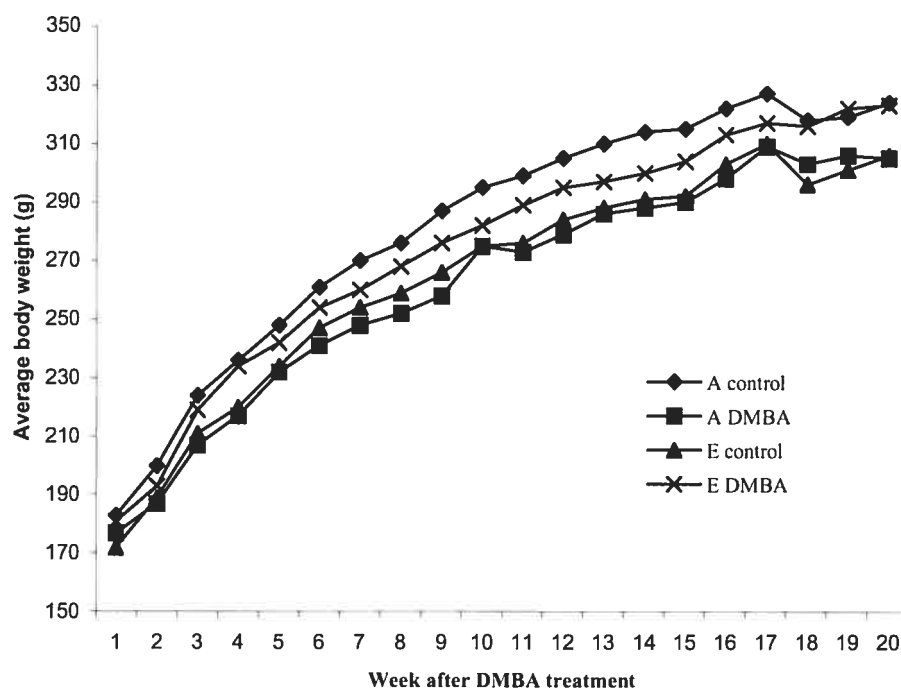


Figure 1: Body weights of rats treated the carcinogen (DMBA) or not (control) and fed adequate (A) or enriched (E) phyloquinone diets.

Table 2 : Total vitamin K (phylloquinone and menaquinone-4) concentrations (pmol/g tissue) in organs and tumours.

Organs	A control (pmol/g)	A DMBA (pmol/g)	E control (pmol/g)	E DMBA (pmol/g)
Spleen	252.4±19.3	228.5±27.7	644.5±56.6*	498.7±83.3*
Liver	242.7±21.4	269.7±23.3	713.3±83.8*	667.4±105.9*
Ovary	469.4±39.6	562±42.6	773.9±111.9*	774.0±62.4*
Heart	180.7±11.9	197.5±12.7	633.3±56.9*	718.4±33.6*
Tumours				
Range		223.5-1452.2		777.0- 2582.0
Mean ± SD		661.8±145.2		1679.5±902.5

Values are mean ± SEM. Organs: n = 6; tumours: group A DMBA, n = 9, group E DMBA, n = 2.

* $p < 0.05$ compared to A diet

Table 3: Tumour outcome in each group.

Groups	Number of rats	Number of rats with tumours	Total number of tumours	Number of tumours per rat	Average number of tumours in tumour bearing rats
A control	15	0	0	0	0
A DMBA	14	6 (43%)	11	0.79 ± 0.28	1.83 ± 0.31
E control	15	0	0	0	0
E DMBA	14	4 (29%)	4*	0.29 ± 0.13	1.00 ± 0.00

* $p < 0.05$ compared to A DMBA

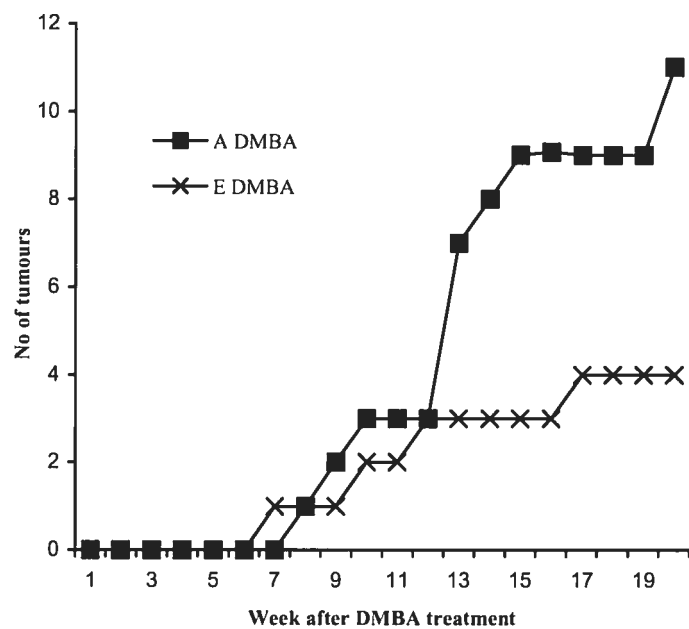


Figure 2: Latency appearance of palpable mammary tumour post-treatment.

Table 4: Plasma concentration of dienes and hydroperoxides (ROOH) in each group.

Group	Dienes (D.O)	ROOH (Mol/L)
A control	0,177 ± 0.056	1,90 E ⁻⁰⁵ ± 0.71 E ⁻⁰⁵
A DMBA	0,224 ± 0.004	3,72 E ⁻⁰⁵ ± 0.58 E ⁻⁰⁵
E control	0,337 ± 0.013* ^ψ	3,09 E ⁻⁰⁵ ± 0.50 E ⁻⁰⁵
E DMBA	0,309 ± 0.011* ^{ψ+}	3,17 E ⁻⁰⁵ ± 0.44 E ⁻⁰⁵

* $p < 0.05$ compared to A control

^ψ $p < 0.05$ compared to A DMBA

+ $p < 0.05$ compared to E control

Table 5: Plasma concentration of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione and their ratio in each group.

Group	GSH (μM)	GSSG (μM)	GSH/GSSG
A control	767 \pm 27	14.7 \pm 0.35	52.1 \pm 1.8
A DMBA	1065 \pm 118*	15.6 \pm 0.64	68.9 \pm 9.0
E control	994 \pm 48*	16.2 \pm 0.62	61.8 \pm 3.1
E DMBA	892 \pm 32	21.2 \pm 2.66* ^{ψ} ⁺	45.2 \pm 4.6

* $p < 0.05$ compared to A control

^{ψ} $p < 0.05$ compared to A DMBA

⁺ $p < 0.05$ compared to E control

IV. DISCUSSION

1. Sommaire et discussion des résultats présentés dans l'article

Les résultats présentés dans l'article portent principalement sur l'effet de l'apport en phyloquinone sur la tumorigénèse mammaire chez le rat. De plus, les résultats relatifs aux marqueurs de l'oxydation lipidique (dienes conjugués et hydroperoxydes) et aux antioxydant (GSH et GSSG) y sont également traités.

1.1 CONSOMMATION ALIMENTAIRE ET ÉVOLUTION PONDÉRALE

La consommation alimentaire moyenne par rat était de 116g par semaine. Ainsi, la consommation de phyloquinone hebdomadaire était de l'ordre de 58 µg pour les animaux du groupe A et de 232 µg pour ceux du groupe E. Tel que présenté à la **figure 1**, le poids des rats n'a pas varié de façon significative entre les groupes au cours de la période expérimentale.

1.2 CONCENTRATION TISSULAIRE DE VITAMINE K

Le **tableau 2** illustre les résultats des concentrations moyennes de vitamine K totale, soit phyloquinone et ménaquinone-4, pour la rate, le foie, l'ovaire, le cœur et les tumeurs dans les différents groupes. En accord avec la littérature, nos résultats montrent une augmentation significative des taux tissulaires de vitamine K en fonction de l'apport alimentaire en phyloquinone pour tous les organes dosés ($p < 0,05$). À l'exception du foie, la forme prédominante dans les organes et tumeurs était la ménaquinone-4 (données

non démontrées) (Tjissen, 1994) (Ferland, 1997) (Ronden, 1998). Aussi, à l'intérieur d'un même groupe de diète, le traitement avec le DMBA n'a eu aucun effet significatif sur les concentrations tissulaires en vitamine K totale. Du côté des tumeurs, il est intéressant de constater une importante accumulation de vitamine K et une grande variabilité des concentrations entre les différents échantillons ; les concentrations s'échelonnant de 225 à 1450 pmol/g et de 775 à 2600 pmol/g pour les groupes A et E respectivement.

1.3 TUMEURS

Aucun animal des groupes non traités au DMBA n'a développé de tumeurs. L'autopsie n'a révélé aucune métastase chez les animaux ayant reçu le carcinogène. Tel qu'illustré à la **figure 3**, l'apparition de tumeurs palpables était similaire entre les deux groupes. Ainsi, la première tumeur est apparue à la semaine 7 parmi les animaux du groupe A et la semaine 6 parmi ceux du groupe E. Le **tableau 3** présente le sommaire des résultats de la tumorigénèse finale. Comme attendu (Zusman 1997, Minami 1996, Ekstrom 1998), chez les animaux nourris avec la diète adéquate, 6 sur 14 (43%) avaient développé une ou plusieurs tumeurs mammaires à la semaine 20 du protocole. Du côté du groupe enrichie, le nombre d'animaux portant des tumeurs était plus petit, soit 4 sur 14 (29%), sans toutefois être significativement différent. Dans l'ensemble, tous les paramètres de la tumorigénèse étaient inférieurs pour le groupe E (sans toujours être significativement différent) à l'exception du nombre total de tumeurs. En effet, les 6 rats du groupe A ont développé un total de 11 tumeurs tandis que les 4 du groupe E ont développé 4 tumeurs ($p=0.031$).

Nos résultats ne concordent cependant pas avec ceux de l'équipe d'Israels et al, les seuls travaux où la phylloquinone et un carcinogène, le Benzo(a)pyrène (BP), ont été appliqués dans un modèle animal. Au cours d'une première étude, les auteurs ont observé un développement tumoral significativement plus lent chez des animaux ayant reçu une diète déficiente en phylloquinone que ceux ayant reçu une diète normale. Dans une deuxième étude, l'apparition des tumeurs était plus rapide et la mortalité causée par les tumeurs plus élevée pour les animaux traités à la phylloquinone et au BP comparé à ceux traités uniquement au BP (Israels 1983).

1.4 OXYDATION DES LIPIDES PLASMATIQUES

Le nombre de dienes conjugués plasmatiques n'a pas été influencé par le traitement au DMBA. Par contre, il était significativement augmenté dans le sang des animaux nourris avec une diète enrichie en phylloquinone (**tableau 4**). Chez les animaux du groupe A, la densité optique (DO) correspondante aux molécules de dienes conjugués était de 0,177 et 0,244 pour les non-traités et traités au DMBA respectivement. En comparaison, le plasma des animaux du groupe E montrait des DO moyennes de 0,337 et 0,309 ($p < 0,05$). Par ailleurs, les hydroperoxydes plasmatiques n'ont été influencés ni par la supplémentation en phylloquinone ni par le traitement au DMBA.

À notre connaissance, cette étude est la première où la cytotoxicité de la vitamine K est évaluée en utilisant des marqueurs de l'oxydation lipidique. Dans la littérature, les dommages à l'ADN et la production de radicaux libres sont les marqueurs les plus

fréquemment utilisés. À l'exception de l'équipe d'Israels, qui à deux reprises ont démontré une activité cytotoxique de la phylloquinone au niveau de l'ADN (Israels 1985 et 1987), jusqu'à présent, aucune autre équipe n'a confirmé pour la vitamère un tel potentiel. Deux études ont porté sur les dommages à l'ADN chez des nouveau-nés à la suite de l'administration prophylactique de phylloquinone. Aucune d'entre elles ne montrait d'effet mutagène de la vitamine (Pizer 1995) (Cornelissen 1991). Même en contexte *in vitro*, la phylloquinone n'induisait pas de dommage à l'ADN des cellules embryonnaires de rats (Webster 2000) ou d'une lignée cellulaire cancéreuse (D'odorico 1997). Ces données ont aussi été confirmées en regard de la production de radicaux libres. En effet, la phylloquinone n'induisait pas la production de radicaux libres dans diverses lignées cellulaires normales et cancéreuses (Okayasu 2001).

1.5 ANTIOXYDANTS PLASMATIQUES

Dans l'ensemble, la littérature appuie nos observations à l'effet que la diète enrichie en phylloquinone n'ait pas exacerbé l'effet du DMBA. Par contre, notre modèle expérimental montre un effet plutôt protecteur de la phylloquinone. Il a été proposé que la vitamine K, en raison de son cycle, pourrait potentiellement agir comme antioxydant (Vervoot, 1997) (Canfield, 1985). Effectivement, les résultats de GSH et GSSG présentés au **tableau 5** montrent un glutathion (GSH) présent en quantité plus importante dans le plasma chez les animaux nourris avec une diète enrichie en phylloquinone. La diminution des taux de GSH est associée à une accumulation de radicaux libres et conséquemment une augmentation du stress oxydatif (Murphy, 1989). Ainsi, le taux augmenté de GSH pourrait expliquer l'incidence plus faible de tumeurs

chez les animaux nourris avec une diète enrichie en phylloquinone. Tout récemment, la vitamine K a été, pour la première fois, directement associée à la prévention des dommages oxydatifs. En effet, dans une étude réalisée sur des cellules nerveuses, la vitamine K a diminué la déplétion du GSH induite normalement par les dommages oxydatifs (Li, 2003).

2. Résultats complémentaires

2.1 MÉTHODOLOGIE

2.1.1 Zymographie MMP

Homogénats

Les organes ont été homogénéisés sur glace dans une solution tampon constituée de 250 mM Sucrose, 10 mM Tris-HCL, 10mM HEPES (pH 7.5) à l'aide du polytron (Brinkman Instrument, Rexddale, ON). Après centrifugation à 3000Xg pendant 10 minutes, le contenu en protéine du surnageant a été mesuré selon la méthode de Bradford. Les homogénats ont été entreposés à -20°C jusqu'à l'utilisation.

Zymographie

40 g de protéine du surnageant a été appliqué sur un gel 7,5 % SDS-polyacrylamide (PAGE) contenant 0,1% (p/v) de gélatine. Après l'électrophorèse, le gel a été rincé dans du Triton-X-100 pendant 2 périodes de 15 minutes à température de la pièce, nettoyé avec de l'eau distillée et incubé durant la nuit à 37°C dans une solution 50 mmol/L Tris-HCL (pH 7,6), 20 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂ et 0,02% (v/v) Brij-35. Le lendemain, le gel a été coloré dans une solution 0,1% Coomassie Brilliant blue R-250, 40% méthanol et 10% acide acétique dans l'eau pendant 30 minutes. Le gel a ensuite été décoloré dans une solution 30% méthanol et 10% acide acétique dans l'eau. L'activité gélatinolytique a été détectée par les bandes décolorées sur fond bleu.

2.1.2 Western blot Gas6

Homogénats

Les organes ont été homogénéisés sur glace dans une solution tampon constituée 50mM Tris(pH 7,5), 150mM NaCl , 0,5 mM EDTA (pH 8), 1% Triton-X, 10 ml , 0,5 % NP-40 (5g Tergitol) et inhibiteurs de protéases (pepstatin, leupeptin, aprotinin) à l'aide du polytron (Brinkman Instrument, Rexddale, ON). Après centrifugation à 3000Xg pendant 10 minutes, le contenu en protéine du surnageant a été mesuré selon la méthode de Bradford. Les homogénats ont été entreposés à -20°C jusqu'à l'utilisation.

Western blotting

40 g de protéine du surnageant a été appliqué sur un gel SDS-PAGE sous des conditions réductrices et ensuite transféré sur une membrane PVDF. Les procédures d'immunoblotting ont été exécutés selon le protocole décrit par Beaulieu *et al.* (1999). Les membranes PVDF ont été incubées avec un anticorps primaire, lavées et incubées avec un anticorps secondaire conjugué avec du *horseradish peroxidase*. Le lien IgG a été détecté à l'aide d'un substrat chimioluminescent.

2.1.3 Analyse des données (gas6 et MMP)

Les zymographies et les western blots ont été analysés avec le logiciel ImageJ développé par le National Institute of Health. Les bandes décolorées représentant l'expression des MMP (zymographies) et les bandes foncées représentant l'expression de gas6 sont exprimées en unités arbitraires (pixels). Les différences entre les groupes ont

été analysées avec un t-test (Sigmastat Software, SPSS). Les différences ont été considérées significatives à $p < 0,05$.

2.2 PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

2.2.1 Expression des MMP-2 et MMP-9

La **figure I** présente l'expression des MMP-2 et MMP-9 selon le traitement (DMBA ou contrôle). Chez les animaux nourris avec une diète adéquate, le traitement au DMBA a induit une augmentation significative de l'expression de la MMP-2 dans le foie ($p = 0,03$) et de la MMP-9 dans l'ovaire ($p = 0,03$). Par contre, le carcinogène a induit une diminution significative de l'expression de la MMP-9 dans la rate ($p = 0,02$) des animaux nourris avec une diète enrichie en phylloquinone. À l'exception de ces différences, le traitement au DMBA n'a pas affecté l'expression de ces deux enzymes associées au processus néoplasique (Ellerbroek, 1999) et ce, même si plusieurs travaux ont mis en évidence une augmentation de l'expression des MMP-2 et MMP-9 dans diverses tumeurs humaines et lignées cellulaires cancéreuses (Powell, 1996). Dans le développement néoplasique, ces protéases contribuent à la prolifération des cellules tumorales et l'angiogénèse, des étapes cruciales à l'invasion néoplasique (Afzal, 1998). Par contre, les tumeurs développées par nos animaux n'ont engendré aucune métastase et l'examen histopathologique a démontré un type cellulaire bénin. Aussi, l'absence d'une modulation de l'expression des MMP observée dans la présente étude, pourrait être expliqué par le modèle expérimental utilisé.

Tel qu'illustré à la **figure II**, l'expression des MMP-2 et MMP-9 dans les organes et les tumeurs n'est pas affectée par la teneur en phylloquinone de l'alimentation des animaux. À notre connaissance, c'est la première fois que le lien entre la vitamine K et l'expression de ces enzymes est étudié. Sur la base de ces résultats, la vitamine K ne semble pas affecter l'expression de ces deux MMP dans les tissus étudiés, lorsque présente en quantité physiologique.

Par ailleurs, l'expression individuelle de chacune des MMP varie grandement d'un tissu à l'autre. Par exemple, l'expression de la MMP-2 est prédominante dans le cœur, l'ovaire et les tumeurs, tandis que la MMP-9 est prédominante dans le foie, le poumon et la rate. La distribution spécifique des MMP-2 et MMP-9 dans les différents organes n'a jusqu'à ce jour pas encore été étudiée. Par contre, on sait que l'activité des MMP est finement régulée par plusieurs facteurs tels que l'expression génétique et, comme nous l'avons vu précédemment, les *Tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) (Ellerbroek, 1999). Ainsi, on peut penser que ces facteurs diffèrent en fonction des tissus, ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus.

2.2.2 Expression de *gas6*

L'expression de la protéine *gas6* selon le traitement (DMBA ou contrôle) est illustrée à la **figure III**. Chez les animaux traités au DMBA et ce, pour les deux niveaux de diète, l'expression de la protéine est significativement augmentée dans le foie; $p=0,02$ pour le groupe recevant une diète adéquate et $p=0,001$ une diète enrichie. Par contre,

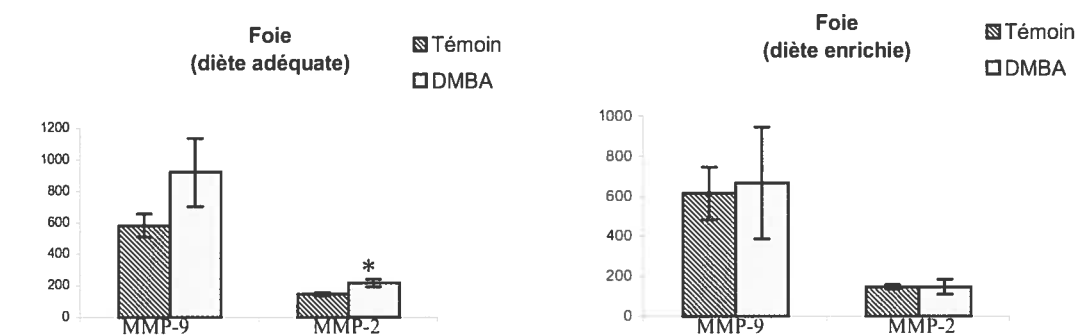
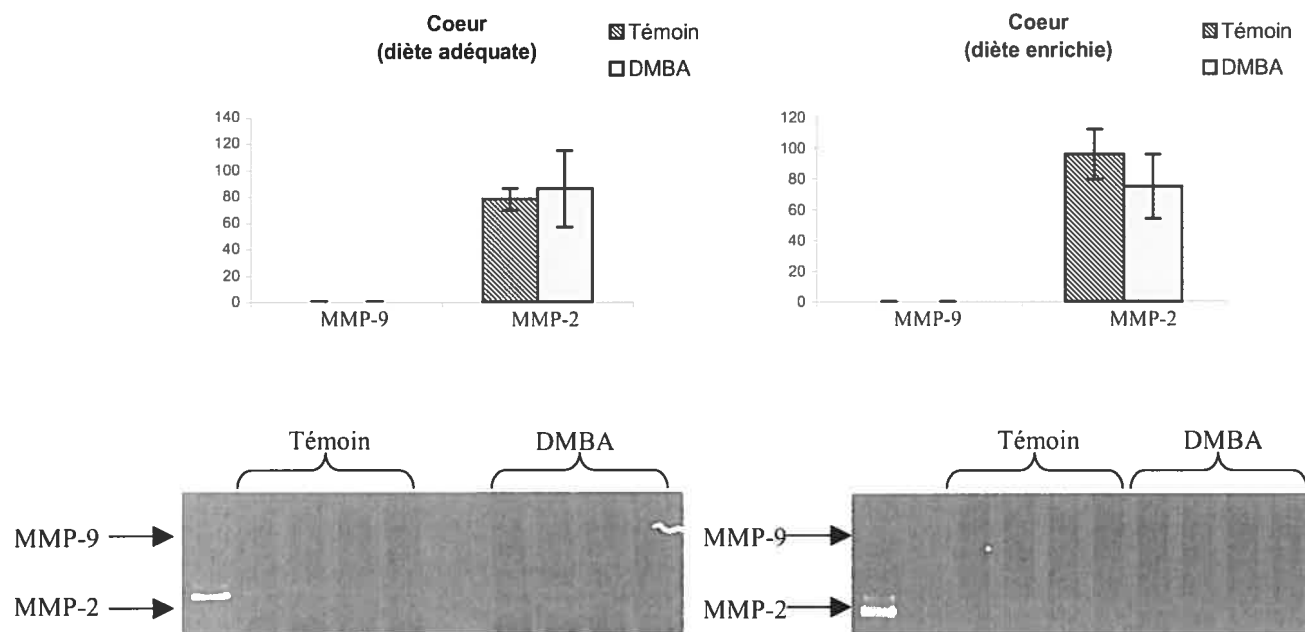
l'expression de la protéine n'a pas été affectée dans les autres organes peu importe la teneur en phylloquinone de la diète. Cette action spécifique au niveau du foie pourrait s'expliquer par le fait que la production des métabolites actifs du DMBA induisant la tumorigénèse mammaire a lieu dans cet organe (Feuer, 1974). Ainsi, la production de métabolites nocifs dans les cellules hépatiques engendrerait une augmentation de la protéine gas6, afin de prévenir la mort cellulaire dans ce tissu, une action observée in vitro pour certains types cellulaires (Nakano, 1995 et 1996) (Li, 1996).

Tel qu'illustré à la **figure IV**, l'expression de gas6 n'est pas influencée par la teneur en phylloquinone de l'alimentation des animaux. Même s'il est reconnu que gas6 est une protéine dépendante de la vitamine K, encore aucune étude a tenté de relier les apports en vitamine K et l'expression de la protéine. Dans ce travail nous avons étudié l'expression de la protéine totale, mais il aurait été intéressant d'étudier la forme carboxylée de la protéine qui elle est davantage susceptible de varier en fonction l'apport en vitamine K. Rappelons que l'action de la vitamine K en regard des protéines se situe au niveau post-traductionnel (Shearer, 1995). Ainsi, la mesure de la forme carboxylée de la protéine aurait davantage reflété l'impact de l'apport en vitamine K sur l'activité de gas6. Toutefois, l'accès à un anticorps spécifique de la forme carboxylée n'était pas disponible au moment de la réalisation de ces travaux.

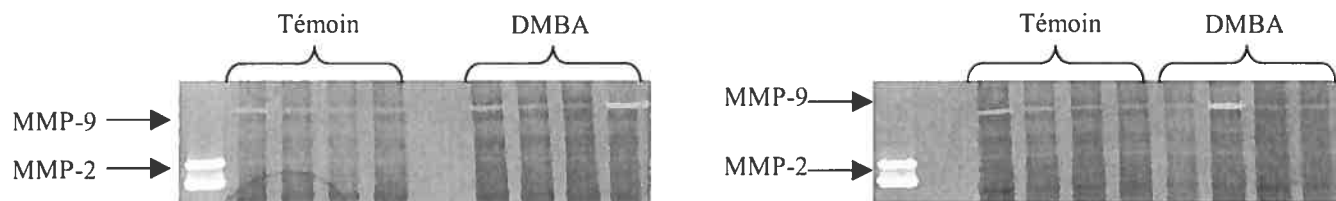
Par ailleurs et en accord avec la littérature, l'expression de gas6 a été observée dans tous les organes étudiés et ce, à des degrés d'intensité variable (Manfioletti, 1993) (Loeser, 1997) (Prieto, 1999). La présente étude a toutefois mis en évidence pour la

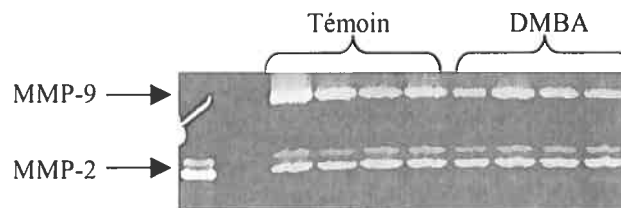
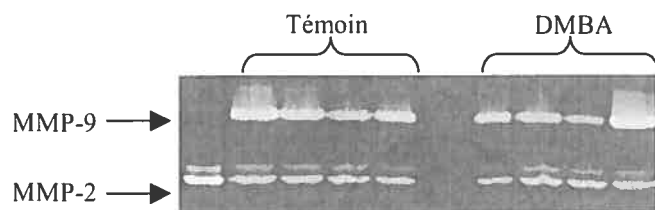
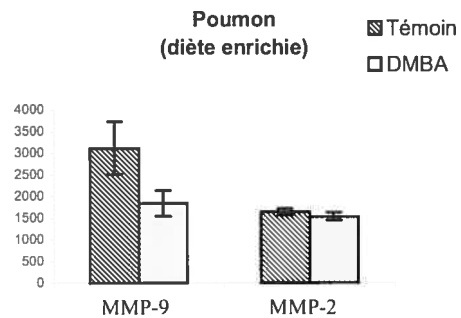
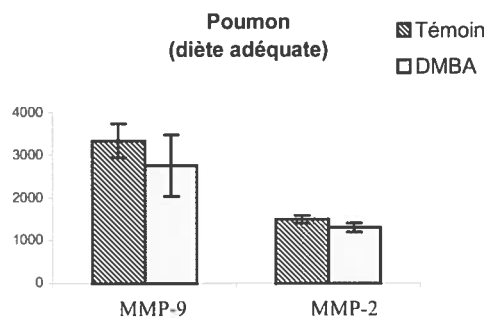
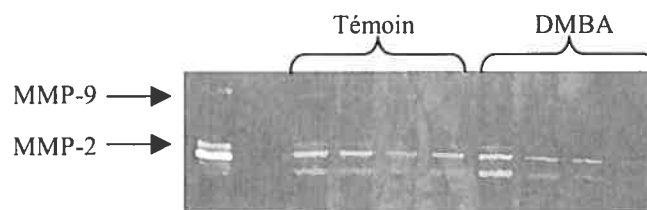
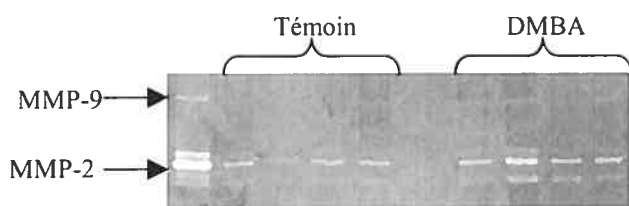
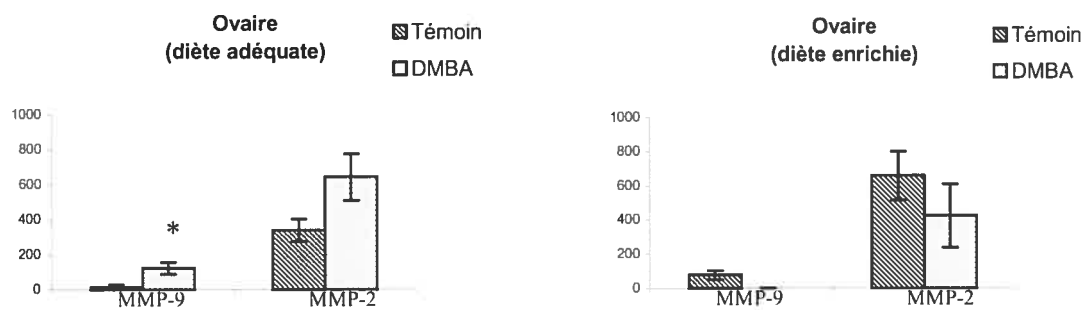
première fois l'absence d'expression de gas6 dans le tissu tumoral. Ainsi, il semble que la prolifération cellulaire inhérente au développement de tumeurs mammaires n'implique pas directement la protéine gas6.

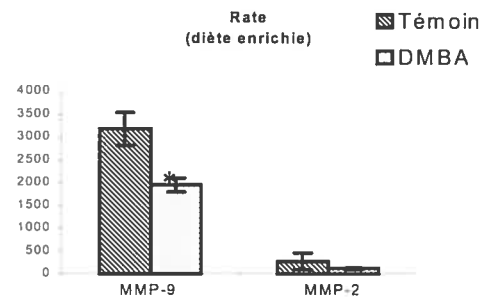
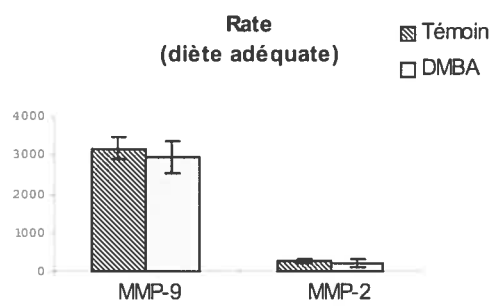
Figure I : Expression des MMP-2 et MMP-9 selon le traitement



*Pour MMP-2 : DMBA est significativement différent de Témoin ($p=0,03$)



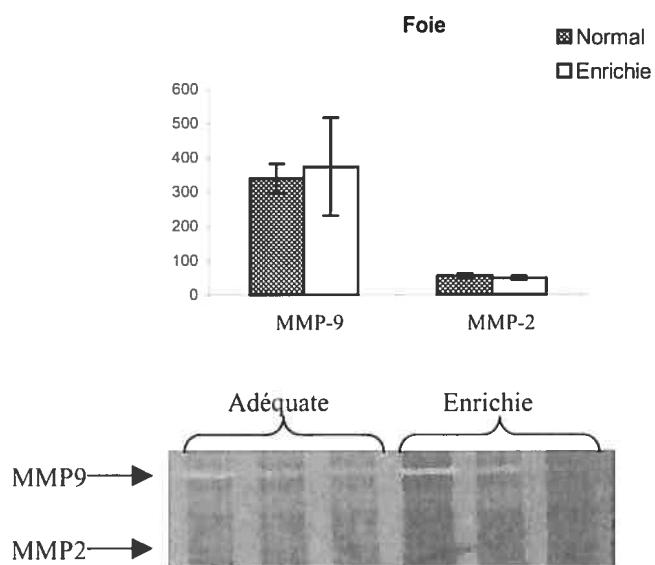
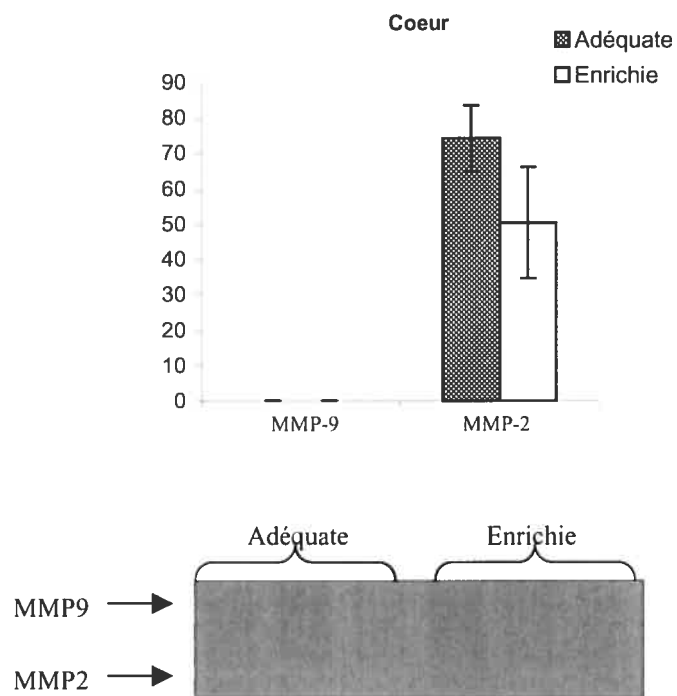


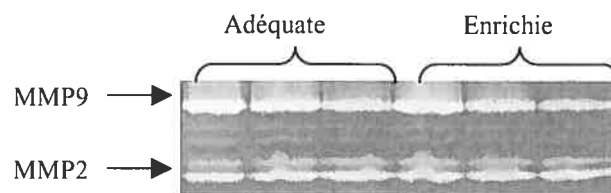
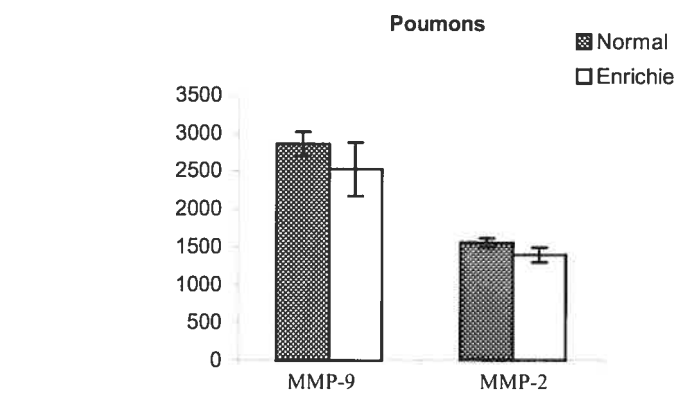
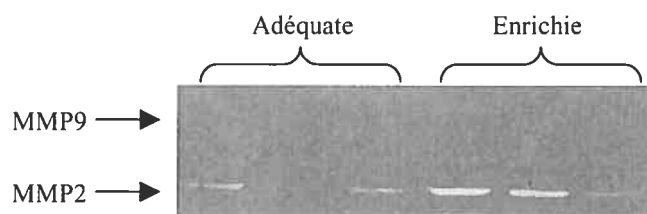
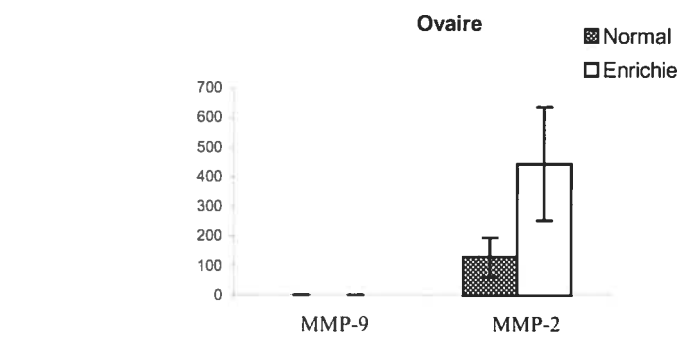


*Pour MMP-9 : DMBA est significativement différent de Témoin ($p=0,02$)



Figure II :Expression des MMP-2 et MMP-9 selon la diète





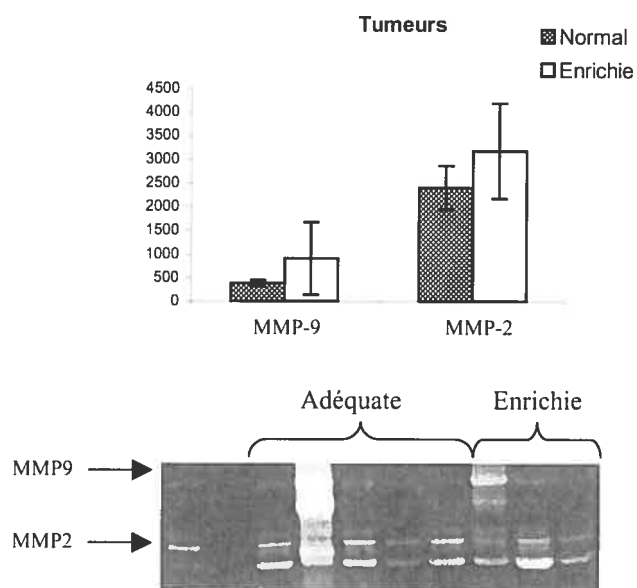
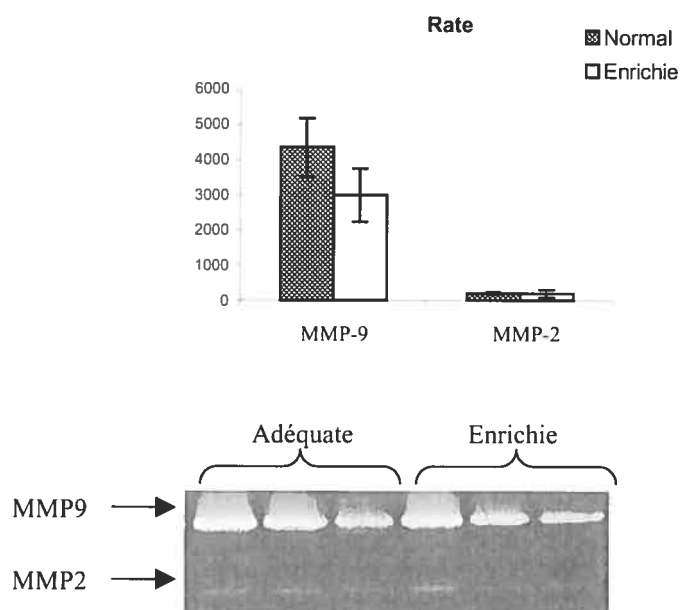
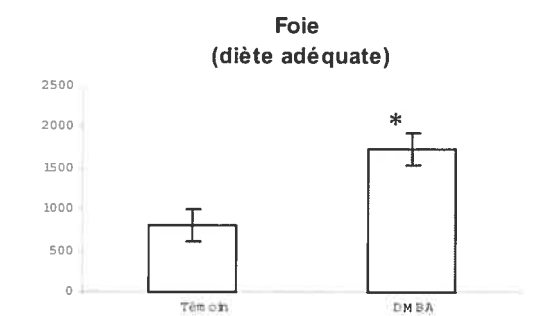
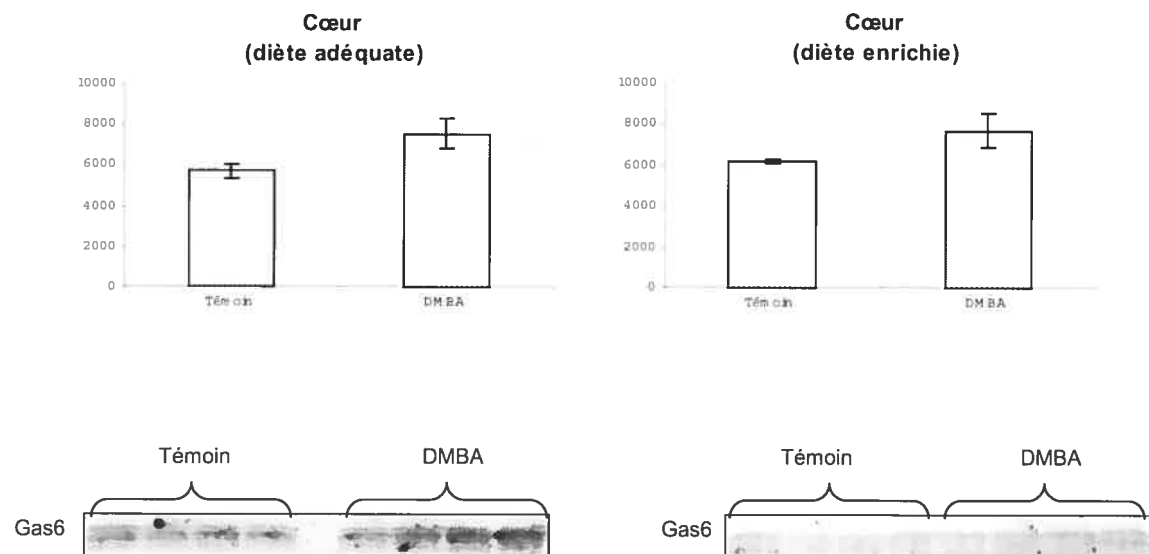
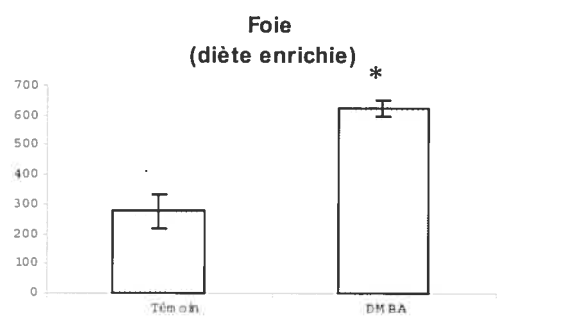
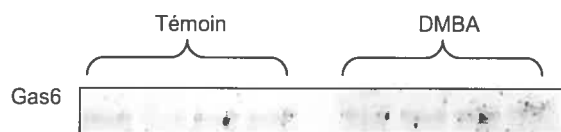


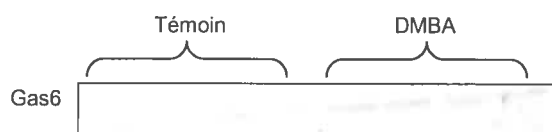
Figure III :Expression de Gas6 selon le traitement



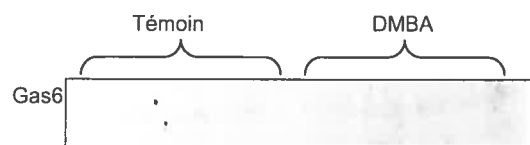
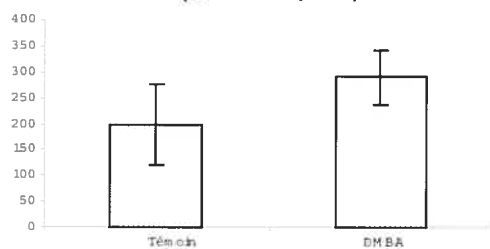
* DMBA est significativement différent de Témoin ($p=0,02$)



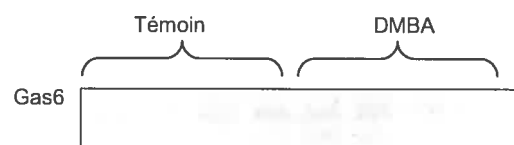
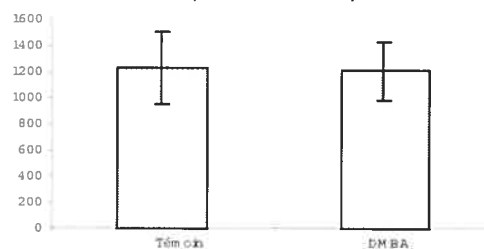
* DMBA est significativement différent de Témoin ($p=0,01$)



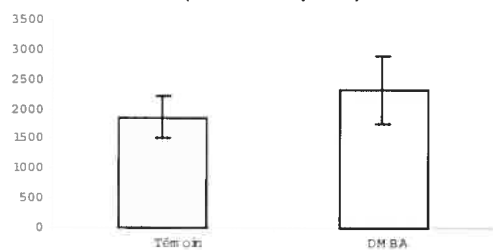
Ovaire
(diète adéquate)



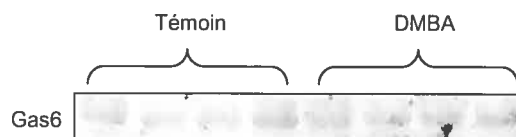
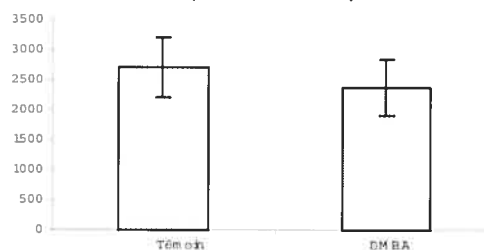
Ovaire
(diète enrichie)



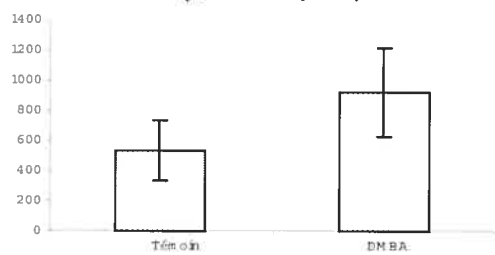
Poumon
(diète adéquate)



Poumon
(diète enrichie)



Rate
(diète adéquate)



Rate
(diète enrichie)

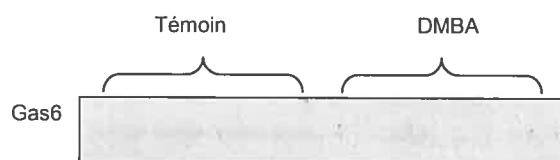
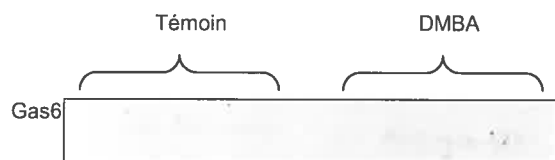
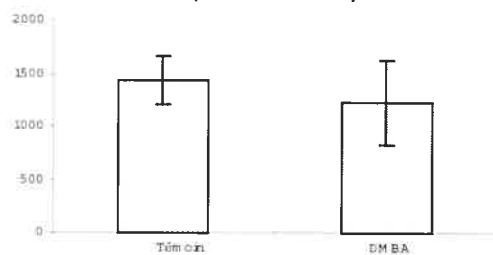
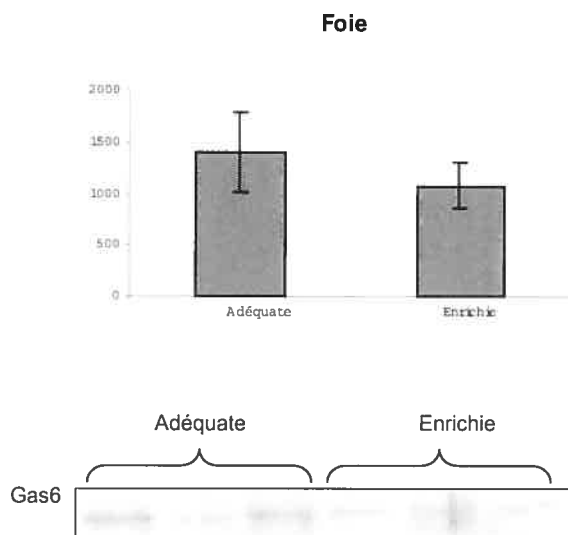
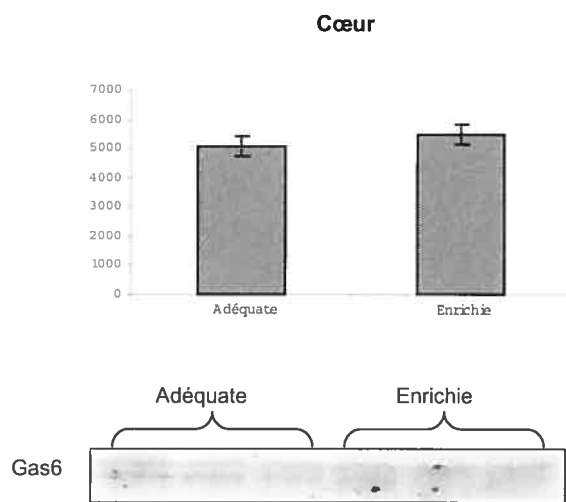
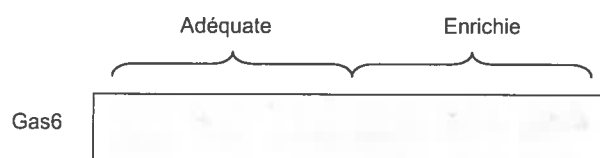
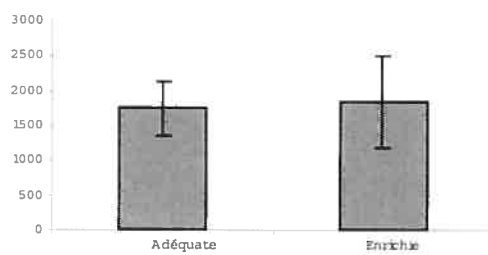
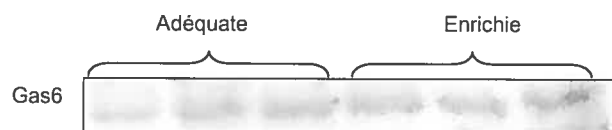
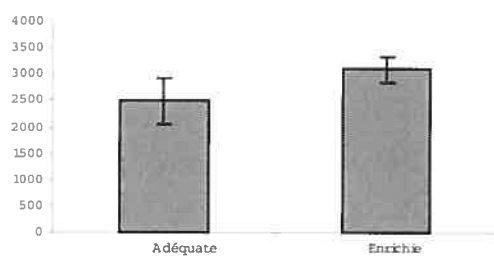
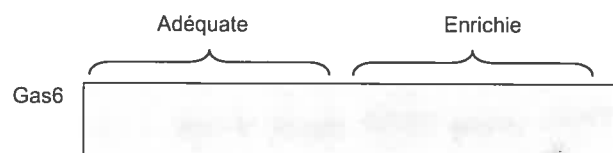
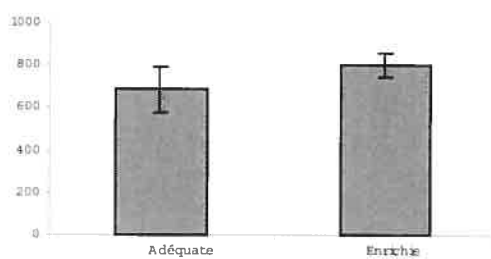


Figure IV :Expression de Gas6 selon la diète

Ovaire**Poumon**

Rate**Tumeurs**

V. CONCLUSION

En conclusion, l'administration de quantités physiologiques de vitamine K à des rates traitées avec un carcinogène (DMBA) n'a pas influencé de manière statistiquement significative le processus de tumorigénèse mammaire. Toutefois, les résultats de la présente étude ont mis en évidence une tendance dans le sens d'une diminution de l'incidence de tumeurs mammaires chez les rates recevant une diète légèrement enrichie en phylloquinone (environ 3 fois la recommandation) comparativement aux animaux recevant les quantités recommandées. En outre, cet effet protecteur n'a pas été associé à une action particulière de la protéine Gas6 et/ou des enzymes métalloprotéases (MMP). En revanche, l'effet protecteur de la phylloquinone pourrait s'expliquer, du moins en partie, par une modulation du système GSH/GSSG. Toutefois, l'augmentation des taux plasmatiques de dienes oxydés observée chez les animaux ayant reçu la diète enrichie demeure un phénomène inexpliqué et devrait faire l'objet d'études futures.

La controverse entourant l'implication de la vitamine K dans des mécanismes néoplasiques demeure entière. Bien que, la vitamine K ne soit pas traditionnellement associée aux processus de stress oxydatif et/ou à des pathologies telles que le cancer, les résultats du présent projet suggèrent qu'elle pourrait y jouer un rôle non-négligeable. Dans cette étude, nous avons investigué les différents mécanismes néoplasiques potentiellement reliés à la vitamine K. L'augmentation des taux de glutathion plasmatique chez les animaux nourris avec une diète enrichie en

phylloquinone suggère un rôle protecteur de la vitamine K par un processus lié à l'oxydation. Sur la base de ces observations, le lien entre la vitamine K et le stress oxydatif mériterait d'être étudié à l'aide de modèles expérimentaux dans lesquels cet aspect pourrait être approfondi.

VI. RÉFÉRENCES

- Ackerman, R.F., & Estes J.E. (1951) Prognosis in idiopathic thrombophlebitis. *Ann Intern Med* 34: 1846-1849.
- Afzal, S., Lalani, E. N., Poulsom, R., Stubbs, A., Rowlinson, G., Sato, H., Seiki, M., & Stamp, G. W. (1998) MT1-MMP and MMP-2 mRNA expression in human ovarian tumors: possible implications for the role of desmoplastic fibroblasts. *Hum Pathol* 29: 155-165.
- Alessandro, R., Minafra, S., Pucci-Minafra, I., Onisto, M., Garbisa, S., Melchiori, A., Tetlow, L., & Woolley, D. E. (1993) Metalloproteinase and TIMP expression by the human breast carcinoma cell line 8701-BC. *Int J Cancer* 55: 250-255.
- Angelillo-Scherrer, A., de Frutos, P., Aparicio, C., Melis, E., Savi, P., Lupu, F., Arnout, J., Dewerchin, M., Hoylaerts, M., Herbert, J., Collen, D., Dahlback, B., & Carmeliet, P. (2001) Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med* 7: 215-221.
- Ansell, P., Bull, D., & Roman, E. (1996) Childhood leukaemia and intramuscular vitamin K: findings from a case-control study. *Bmj* 313: 204-205.
- Baron, J. A., Gridley, G., Weiderpass, E., Nyren, O., & Linet, M. (1998) Venous thromboembolism and cancer. *Lancet* 351: 1077-1080.
- Bar-Shavit, R., Kahn, A.J., Mann, K.G., & Wilner, G.D. (1986) Identification of a thrombin sequence with growth factor activity on macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:976-980.
- Beaulieu, E., Kachra, Z., Mousseau, N., Delbecchi, L., Hardy, J., & Beliveau, R. (1999) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human pituitary tumors. *Neurosurgery* 45: 1432-1440.
- Behrman, R.E., Kliegman R.M., & Arvin, A.M. (1996) Textbook of pediatrics 15th ed. Philadelphia :504-505.
- Binkley, N. C., & Suttie, J. W. (1995) Vitamin K nutrition and osteoporosis. *J Nutr* 125: 1812-1821.
- Blanchard, R. A., Furie, B. C., Jorgensen, M., Kruger, S. F., & Furie, B. (1981) Acquired vitamin K-dependent carboxylation deficiency in liver disease. *N Engl J Med* 305: 242-248.
- Bolton-Smith, C., Price, R. J., Fenton, S. T., Harrington, D. J., & Shearer, M. J. (2000) Compilation of a provisional UK database for the phyloquinone (vitamin K1) content of foods. *Br J Nutr* 83: 389-399.

Booth S.L., Sadowski J.A., Weihrauch J.L., Ferland G. (1993) Vitamin K₁ (phyloquinone) content of foods: A provisional table. *J Food Comp Anal* 6:109-20.

Booth S.L., Sadowski J.A., & Pennington, J.A.T. (1995) Phylloquinone (Vitamin K₁) content of foods in the U-S food and drug administration's total diet study. *J Agric Food Chem* 43 : 1574-1579.

Bourguignon, L. Y., Gunja-Smith, Z., Iida, N., Zhu, H. B., Young, L. J., Muller, W. J., & Cardiff, R. D. (1998) CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J Cell Physiol* 176: 206-215.

Canfield, L. M., Davy, L. A., & Thomas, G. L. (1985) Anti-oxidant/pro-oxidant reactions of vitamin K. *Biochem Biophys Res Commun* 128: 211-219.

Chen, J., Carey, K., & Godowski, P. J. (1997) Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene* 14: 2033-2039.

Colucci, M., Giavazzi, R., Alessandri, G., Semeraro, N., Mantovani, A., & Donati, M.B.(1981) Procoagulant activity of sarcoma sublines with different metastatic potential. *Blood* 57:733-735.

Cornelissen, M., Smeets, D., Merckx, G., De Abreu, R., Kollee, L., & Monnens, L. (1991) Analysis of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral blood lymphocytes of newborns after vitamin K prophylaxis at birth. *Pediatr Res* 30: 550-553.

Crosier, K. E., & Crosier, P. S. (1997) New insights into the control of cell growth; the role of the AxI family. *Pathology* 29: 131-135.

Curatolo, L., Colucci, M., Cambini, A.L., Poggi, A., Morasca, L., Donati, M.B., & Semeraro, N. (1979) Evidence that cells from experimental tumours can activate coagulation factor X. *Br J Cancer* 40:228-233.

Dam, H. (1942) Vitamin K, it's chemistry and physiology. *Adv Enzymol* 2:285-324.

Davidson, R. T., Foley, A. L., Engelke, J. A., & Suttie, J. W. (1998) Conversion of dietary phylloquinone to tissue menaquinone-4 in rats is not dependent on gut bacteria. *J Nutr* 128: 220-223.

D'Odorico, A., Sturniolo, G. C., Bilton, R. F., Morris, A. I., Gilmore, I. T., & Naccarato, R. (1997) Quinone-induced DNA single strand breaks in a human colon carcinoma cell line. *Carcinogenesis* 18: 43-46.

Doisy, E.A., Binkley, S.B. & Thayer, S.A. (1941) Vitamin K. *Chem Rev* 28:477-517.

Dowd, P., Ham, S. W., Naganathan, S., & Hershline, R. (1995) The mechanism of action of vitamin K. *Annu Rev Nutr* 15: 419-440.

Dickinson, D.A., & Forman, H.J. (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64: 1019-1026.

Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A., & Karsenty, G. (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382: 448-452.

Dvorak, H.F., Senger, D.R., & Dvorak, A.M. (1983) Fibrin as a component of the tumor stroma: origins and biological significance. *Cancer Metastasis Rev* 2: 41-73.

Dvorak, H.F. (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 315:1650-1659.

Ekelund, H., Finnstrom, O., Gunnarskog, J., Kallen, B., & Larsson, Y. (1993) Administration of vitamin K to newborn infants and childhood cancer. *Bmj* 307: 89-91.

Ekstrom, T., Mild, K.H., & Holmberg, B. (1998) Mammary tumours in Sprague-Dawley rats after initiation with DMBA followed by exposure to 50 Hz electromagnetic fields in a promotional scheme. *Cancer Lett* 123: 107-11.

Ellerbroek, S. M., & Stack, M. S. (1999) Membrane associated matrix metalloproteinases in metastasis. *Bioessays* 21: 940-949.

el-Saadani, M., Esterbauer, H., el-Sayed, M., Goher, M., Nassar, A.Y., & Jurgens, G. (1989) A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *J Lipid Res* 30: 627-630.

Favier A. (1997) Oxidative stress: value of its demonstration in medical biology and problems posed by the choice of a marker. *Ann Biol Clin* 55 :9-16.

Ferland, G., Mainville, D. & Doucet, I. (1997) Vitamin K₁ (VK₁) and menaquinone-4 tissue distribution in 3, 12 and 22 month old male and female rats fed a low, adequate or high VK₁ diet. *FASEB J* 11: A192.

Ferland, G. (1998) The vitamin K-dependent proteins: an update. *Nutr Rev* 56: 223-230.

Ferland G. (2001) Vitamine K. In, Russell RM & Bowman B, Present knowledge in nutrition. 8th edition. Washington, DC: ILSI Press.;164-172.

Ferland, G., Sadowski, J. A., & O'Brien, M. E. (1993) Dietary induced subclinical vitamin K deficiency in normal human subjects. *J Clin Invest* 91: 1761-1768.

- Fernandez-Patron, C., Zhang, Y., Radomski, M. W., Hollenberg, M. D., & Davidge, S. T. (1999) Rapid release of matrix metalloproteinase (MMP)-2 by thrombin in the rat aorta: modulation by protein tyrosine kinase/phosphatase. *Thromb Haemost* 82: 1353-1357.
- Feuer, G. & Kellen, J.A. (1974) Link between carcinogenicity and hepatic metabolism of 7,12-dimethylbenz(alpha)anthracene. *Oncology* 30:499-508.
- Fisher, M.M., Hochberg, L.A., & Wilensky, N.D. (1951) Recurrent thrombophlebitis in obscure malignant tumor of the lung. *JAMA* 147: 1213-1216.
- Food and Nutrition Board. (1987) Vitamin tolerance of animals. Washington DC: National Academy Press.
- Fraser, J. D., & Price, P. A. (1988) Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein. Implications for the possible functions of matrix Gla protein and for the tissue distribution of the gamma-carboxylase. *J Biol Chem* 263: 11033-11036.
- Feskanich, D., Weber, P., Willett, W.C., Rockett, H., Booth, S.L., & Colditz, G.A. (1999) Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study. *Am J Clin Nutr* 69:74-79.
- Furie, B., Bouchard, B.A., & Furie, B.C. (1999) Vitamin K-dependent biosynthesis of γ -carboxyglutamic acid. *Blood*;93:1798-1808.
- Galdal, K.S., Lyberg, T., Evensen, S.A., Nilsen, E., & Prydz, H. (1985) Thrombin induces thromboplastin synthesis in cultured vascular endothelial cells. *Thromb Haemost* 54:373-376.
- Gelboin, H. V. (1980) Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev* 60: 1107-1166.
- Godowski, P. J., Mark, M. R., Chen, J., Sadick, M. D., Raab, H., & Hammonds, R. G. (1995) Reevaluation of the roles of protein S and Gas6 as ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro 3. *Cell* 82: 355-358.
- Golding, J., Paterson, M., & Kinley, L.J. (1990) Factors associated with childhood cancer in a national cohort study. *Br J Cancer* 62: 304-308.
- Golding, J., Greenwood, R., Birmingham, K., & Mott, M. (1992) Childhood cancer, intramuscular vitamin K, and pethidine given during labour. *Bmj* 305: 341-346.
- Gore, J. M., Appelbaum, J. S., Greene, H. L., Dexter, L., & Dalen, J. E. (1982) Occult cancer in patients with acute pulmonary embolism. *Ann Intern Med* 96: 556-560.

- Goruppi, S., Chiaruttini, C., Ruaro, M. E., Varnum, B., & Schneider, C. (2001) Gas6 induces growth, beta-catenin stabilization, and T-cell factor transcriptional activation in contact-inhibited C57 mammary cells. *Mol Cell Biol* 21: 902-915.
- Greenberg, E., Divertie, M.B. & Woolner, L.B. (1964) A review of unusual systematic manifestations associated with carcinoma. *Am J Med* 36:106-120.
- Hauschka, P. V., Lian, J. B., Cole, D. E., & Gundberg, C. M. (1989) Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 69: 990-1047.
- Hauschka, P.V., Haroon, Y., Buchthal, S.D., & Bell, R.G. (1986) Vitamin K-dependent processes in tumor cells. *Haemostasis* 16: 273-87.
- Hejna, M., Raderer, M., & Zielinski, C. C. (1999) Inhibition of metastases by anticoagulants. *J Natl Cancer Inst* 91: 22-36.
- Ishihara, M., Takayama, F., Toguchi, M., Nakano, K., Yasumoto, E., Nakayachi, T., Satoh, K., & Sakagami, H. (2000) Cytotoxic activity of polyprenylalcohols and vitamin K2 derivatives. *Anticancer Res* 20: 4307-4313.
- Israels, L. G. (1994) Controversies concerning vitamin K and the newborn. *Pediatrics* 93: 156-157.
- Israels, L. G., Friesen, E., Jansen, A. H., & Israels, E. D. (1987) Vitamin K1 increases sister chromatid exchange in vitro in human leukocytes and in vivo in fetal sheep cells: a possible role for "vitamin K deficiency" in the fetus. *Pediatr Res* 22: 405-408.
- Israels, L. G., & Israels, E. D. (1995) Observations on vitamin K deficiency in the fetus and newborn: has nature made a mistake? *Semin Thromb Hemost* 21: 357-363.
- Israels, L. G., Israels, E. D., & Saxena, S. P. (1997) The riddle of vitamin K1 deficit in the newborn. *Semin Perinatol* 21: 90-96.
- Israels, L. G., Ollmann, D. J., & Israels, E. D. (1985) Vitamin K1 as a modulator of benzo(a)pyrene metabolism as measured by in vitro metabolite formation and in vivo DNA-adduct formation. *Int J Biochem* 17: 1263-1266.
- Israels, L. G., Walls, G. A., Ollmann, D. J., Friesen, E., & Israels, E. D. (1983) Vitamin K as a regulator of benzo(a)pyrene metabolism, mutagenesis, and carcinogenesis. Studies with rat microsomes and tumorigenesis in mice. *J Clin Invest* 71: 1130-1140.

- Iwata, H., Kobayashi, S., Iwase, H., Masaoka, A., Fujimoto, N., & Okada, Y. (1996) Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 87: 602-611.
- Jie, K. S., Bots, M. L., Vermeer, C., Witteman, J. C., & Grobbee, D. E. (1995) Vitamin K intake and osteocalcin levels in women with and without aortic atherosclerosis: a population-based study. *Atherosclerosis* 116: 117-123.
- Khalil, A., Wagner, J.R., Lacombe, G., Dangoisse, V., Fulop, T. (1996) Increased susceptibility of low-density lipoprotein (LDL) to oxidation by gamma-radiolysis with age. *FEBS Lett* 392: 45-48.
- Klebanoff, M. A., Read, J. S., Mills, J. L., & Shiono, P. H. (1993) The risk of childhood cancer after neonatal exposure to vitamin K. *N Engl J Med* 329: 905-908.
- Krasinski, S. D., Russell, R. M., Furie, B. C., Kruger, S. F., Jacques, P. F., & Furie, B. (1985) The prevalence of vitamin K deficiency in chronic gastrointestinal disorders. *Am J Clin Nutr* 41: 639-643.
- Lenton, K.J., Therriault, H., & Wagner, J.R. (1999) Analysis of glutathione and glutathione disulfide in whole cells and mitochondria by postcolumn derivatization high-performance liquid chromatography with ortho-phthalaldehyde. *Anal Biochem* 274: 125-130.
- Li, J., Lin, J.C., Wang, H., Peterson, J.W., Furie, B.C., Furie, B., Booth, S.L., Volpe, J.J., & Rosenberg, P.A. (2003) Novel role of vitamin k in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons. *J Neurosci* 23: 5816-5826.
- Li, R., Chen, J., Hammonds, G., Phillips, H., Armanini, M., Wood, P., Bunge, R., Godowski, P. J., Sliwkowski, M. X., & Mather, J. P. (1996) Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells. *J Neurosci* 16: 2012-2019.
- Lieberman, J.S., Borrero, J., Urdaneta, E., & Wright, I.S. (1961) Thrombophlebitis and cancer. *JAMA* 177:542-545.
- Liotta, L. A., Steeg, P. S., & Stetler-Stevenson, W. G. (1991) Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64: 327-336.
- Loeser, R. F., Varnum, B. C., Carlson, C. S., Goldring, M. B., Liu, E. T., Sadiev, S., Kute, T. E., & Wallin, R. (1997) Human chondrocyte expression of growth-arrest-specific gene 6 and the tyrosine kinase receptor axl: potential role in autocrine signaling in cartilage. *Arthritis Rheum* 40: 1455-1465.

Luo, G., Ducky, P., McKee, M. D., Pinero, G. J., Loyer, E., Behringer, R. R., & Karsenty, G. (1997) Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386: 78-81.

Maillard, C., Berruyer, M., Serre, C. M., Dechavanne, M., & Delmas, P. D. (1992) Protein-S, a vitamin K-dependent protein, is a bone matrix component synthesized and secreted by osteoblasts. *Endocrinology* 130: 1599-1604.

Manfioletti, G., Brancolini, C., Avanzi, G., & Schneider, C. (1993) The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol* 13: 4976-4985.

Matshiner, J.T., Zimmerman, A. & Bell, R.G. (1974) Influence of warfarin vitamin K epoxide reductase. *Tromb Diath Haemorrh. Supp* 57: 45-52.

Maurer, L. H., Herndon, J. E., 2nd, Hollis, D. R., Aisner, J., Carey, R. W., Skarin, A. T., Perry, M. C., Eaton, W. L., Zacharski, L. L., Hammond, S., & Green, M. R. (1997) Randomized trial of chemotherapy and radiation therapy with or without warfarin for limited-stage small-cell lung cancer: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 15: 3378-3387.

McKinney, P. A., Juszczak, E., Findlay, E., & Smith, K. (1998) Case-control study of childhood leukaemia and cancer in Scotland: findings for neonatal intramuscular vitamin K. *Bmj* 316: 173-177.

Minami, M., & Noguchi, M. (1996) Effects of low-dose eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid and dietary fat on the incidence, growth and cell kinetics of mammary carcinomas in rats. *Oncology* 53: 398-405.

Monteagudo, C., Merino, M. J., San-Juan, J., Liotta, L. A., & Stetler-Stevenson, W. G. (1990) Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign, and malignant breast tissue. *Am J Pathol* 136: 585-592.

Mosesson, M.W. (2000) Introduction: fibrinogen as a determinant of the metastatic potential of tumor cells. *Blood* 96: 3301.

Mukai, K., Morimoto, H., Kikuchi, S., & Nagaoka, S. (1993) Kinetic study of free-radical-scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K and tocopherol quinone) in solution. *Biochim Biophys Acta* 1157: 313-317.

Murphy, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L., & Coyle, J.T. (1989) Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 2 :1547-58.

Nagase, H. (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378: 151-160.

Nagata, K., Ohashi, K., Nakano, T., Arita, H., Zong, C., Hanafusa, H., & Mizuno, K. (1996) Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271: 30022-30027.

Nakamura, Y. S., Hakeda, Y., Takakura, N., Kameda, T., Hamaguchi, I., Miyamoto, T., Kakudo, S., Nakano, T., Kumegawa, M., & Suda, T. (1998) Tyro 3 receptor tyrosine kinase and its ligand, Gas6, stimulate the function of osteoclasts. *Stem Cells* 16: 229-238.

Nakano, T., Higashino, K., Kikuchi, N., Kishino, J., Nomura, K., Fujita, H., Ohara, O., & Arita, H. (1995) Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca(2+)-mobilizing growth factors. *J Biol Chem* 270: 5702-5705.

Nakano, T., Ishimoto, Y., Kishino, J., Umeda, M., Inoue, K., Nagata, K., Ohashi, K., Mizuno, K., & Arita, H. (1997) Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* 272: 29411-29414.

Nakano, T., Kawamoto, K., Higashino, K., & Arita, H. (1996) Prevention of growth arrest-induced cell death of vascular smooth muscle cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *FEBS Lett* 387: 78-80.

Nakano, T., Kawamoto, K., Kishino, J., Nomura, K., Higashino, K., & Arita, H. (1997) Requirement of gamma-carboxyglutamic acid residues for the biological activity of Gas6: contribution of endogenous Gas6 to the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biochem J* 323 (Pt 2): 387-392.

Nelsestuen, G. L., Shah, A. M., & Harvey, S. B. (2000) Vitamin K-dependent proteins. *Vitam Horm* 58: 355-389.

Newman, P. & Shearer, M.J. Vitamin K metabolism In: *Subcellular biochemistry*. Peter J Quinn ed. New York:455-488.

Nishikawa, Y., Carr, B. I., Wang, M., Kar, S., Finn, F., Dowd, P., Zheng, Z. B., Kerns, J., & Naganathan, S. (1995) Growth inhibition of hepatoma cells induced by vitamin K and its analogs. *J Biol Chem* 270: 28304-28310.

Nordstrom, M., Lindblad, B., Anderson, H., Bergqvist, D., & Kjellstrom, T. (1994) Deep venous thrombosis and occult malignancy: an epidemiological study. *Bmj* 308: 891-894.

Okayasu, H., Ishihara, M., Satoh, K., & Sakagami, H. (2001) Cytotoxic activity of vitamins K1, K2 and K3 against human oral tumor cell lines. *Anticancer Res* 21: 2387-2392.

Olander, J.V., Bremer, M.E., Marasa, J.C., & Feder, J. (1985) Fibrin-enhanced endothelial cell organization. *J Cell Physiol* 125:1-9.

- Olsen, J. H., Hertz, H., Blinkenberg, K., & Verder, H. (1994) Vitamin K regimens and incidence of childhood cancer in Denmark. *Bmj* 308: 895-896.
- Olson, R.E. (1999) Vitamin K. In: *Modern nutrition in health and disease*, 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins: 363-80.
- O'meara, R.A. (1964) Fibrinolytic treatment of cancer. *Lancet* 2: 963.
- Pan, E. Y., Gomperts, E. D., Millen, R., & Gilsanz, V. (1990) Bone mineral density and its association with inherited protein S deficiency. *Thromb Res* 58: 221-231.
- Parker, L., Cole, M., Craft, A. W., & Hey, E. N. (1998) Neonatal vitamin K administration and childhood cancer in the north of England: retrospective case-control study. *Bmj* 316: 189-193.
- Parsons, S.L., Watson, S.A., Brown, P.D., Collins, H.M. & Steele R.J. (1997) Matrix metalloproteinases. *Br J Surg* 84:160-6.
- Passmore, S. J., Draper, G., Brownbill, P., & Kroll, M. (1998) Case-control studies of relation between childhood cancer and neonatal vitamin K administration. *Bmj* 316: 178-184.
- Passmore, S. J., Draper, G., Brownbill, P., & Kroll, M. (1998) Ecological studies of relation between hospital policies on neonatal vitamin K administration and subsequent occurrence of childhood cancer. *Bmj* 316: 184-189.
- Pizer, B., Boyse, J., Hunt, L., & Mott, M. (1995) Neonatal vitamin K administration and in vivo somatic mutation. *Mutat Res* 347: 135-139.
- Poulsom, R., Hanby, A. M., Pignatelli, M., Jeffery, R. E., Longcroft, J. M., Rogers, L., & Stamp, G. W. (1993) Expression of gelatinase A and TIMP-2 mRNAs in desmoplastic fibroblasts in both mammary carcinomas and basal cell carcinomas of the skin. *J Clin Pathol* 46: 429-436.
- Powell, W. C., & Matrisian, L. M. (1996) Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Curr Top Microbiol Immunol* 213 (Pt 1): 1-21.
- Prandoni, P., Lensing, A. W., Buller, H. R., Cogo, A., Prins, M. H., Cattelan, A. M., Cuppini, S., Noventa, F., & ten Cate, J. W. (1992) Deep-vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *N Engl J Med* 327: 1128-1133.
- Price, P. A. (1988) Role of vitamin-K-dependent proteins in bone metabolism. *Annu Rev Nutr* 8: 565-583.

Price, P. A., & Williamson, M. K. (1985) Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J Biol Chem* 260: 14971-14975.

Price, P.A., Faus, S.A., & Williamson, M.K. (1998) Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1400-7.

Prieto, A. L., Weber, J. L., & Lai, C. (2000) Expression of the receptor protein-tyrosine kinases Tyro-3, Axl, and mer in the developing rat central nervous system. *J Comp Neurol* 425: 295-314.

Prieto, A. L., Weber, J. L., Tracy, S., Heeb, M. J., & Lai, C. (1999) Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system. *Brain Res* 816: 646-661.

Pryor, W.A., & Castle, L. (1984) Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. *Methods Enzymol* 105: 293-299.

Roach, H. I. (1994) Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biol Int* 18: 617-628.

Roman, E., Fear, N. T., Ansell, P., Bull, D., Draper, G., McKinney, P., Michaelis, J., Passmore, S. J., & von Kries, R. (2002) Vitamin K and childhood cancer: analysis of individual patient data from six case-control studies. *Br J Cancer* 86: 63-69.

Ronden, J.E., Thijssen, H.H.W. & Vermeer, C. (1998) Tissue distribution of K-vitamins under different nutritional regimens in the rat. *Biochem Biophys Acta* 1379: 16-22.

Sadowski, J. A., Hood, S. J., Dallal, G. E., & Garry, P. J. (1989) Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration. *Am J Clin Nutr* 50: 100-108.

Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., & Seiki, M. (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370: 61-65.

Savage, D., Lindenbaum, J. (1983) Clinical and experimental human vitamin K deficiency. In: Lindenbaum J. Ed. *Nutrition in hematology*. New York : Churchill Livingstone: 271-320.

Saxena, S. P., Fan, T., Li, M., Israels, E. D., & Israels, L. G. (1997) A novel role for vitamin K1 in a tyrosine phosphorylation cascade during chick embryogenesis. *J Clin Invest* 99: 602-607.

Saxena, S. P., Israels, E. D., & Israels, L. G. (2001) Novel vitamin K-dependent pathways regulating cell survival. *Apoptosis* 6: 57-68.

Schulman, S., & Lindmarker, P. (2000) Incidence of cancer after prophylaxis with warfarin against recurrent venous thromboembolism. Duration of Anticoagulation Trial. *N Engl J Med* 342: 1953-1958.

Shearer, M. J. (1997) The roles of vitamins D and K in bone health and osteoporosis prevention. *Proc Nutr Soc* 56: 915-937.

Shearer, M. J. (1995) Vitamin K. *Lancet* 345: 229-234.

Shearer, M. J. (1990) Vitamin K and vitamin K-dependent proteins. *Br J Haematol* 75: 156-162.

Shearer, M. J. (1992) Vitamin K metabolism and nutriture. *Blood Rev* 6: 92-104.

Shearer, M. J., Bach, A., & Kohlmeier, M. (1996) Chemistry, nutritional sources, tissue distribution and metabolism of vitamin K with special reference to bone health. *J Nutr* 126: 1181S-1186S.

Shearer, M. J., Bechtold, H., Andrassy, K., Koderisch, J., McCarthy, P. T., Trenk, D., Jahnchen, E., & Ritz, E. (1988) Mechanism of cephalosporin-induced hypoprothrombinemia: relation to cephalosporin side chain, vitamin K metabolism, and vitamin K status. *J Clin Pharmacol* 28: 88-95.

Shearer, M. J., McBurney, A., & Barkhan, P. (1974) Studies on the absorption and metabolism of phylloquinone (vitamin K₁) in man. *Vitam Horm* 32: 513-542.

Shibayama-Imazu, T., Sakairi, S., Watanabe, A., Aiuchi, T., Nakajo, S., & Nakaya, K. (2003) Vitamin K(2) selectively induced apoptosis in ovarian TYK-nu and pancreatic MIA PaCa-2 cells out of eight solid tumor cell lines through a mechanism different from geranylgeraniol. *J Cancer Res Clin Oncol* 129:1-11.

Société canadienne de pédiatrie (1997) L'administration systématique de vitamine K aux nouveaux-nés. *Paediatrics & Child Health* 2 : 432-434.

Sokoll, L. J., & Sadowski, J. A. (1996) Comparison of biochemical indexes for assessing vitamin K nutritional status in a healthy adult population. *Am J Clin Nutr* 63: 566-573.

Sorensen, H. T., Mellekjaer, L., Steffensen, F. H., Olsen, J. H., & Nielsen, G. L. (1998) The risk of a diagnosis of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism. *N Engl J Med* 338: 1169-1173.

Sproul, E.E. (1938) Carcinoma and venous thrombosis: the frequency of association of carcinoma in the body or tail of the pancreas with multiple venous thrombosis. *Am J Cancer* 34: 566-585.

Stitt, T. N., Conn, G., Gore, M., Lai, C., Bruno, J., Radziejewski, C., Mattsson, K., Fisher, J., Gies, D. R., Jones, P. F., & et al. (1995) The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* 80: 661-670.

Suttie, J. W. (1995) The importance of menaquinones in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 15: 399-417.

Suttie, J. W. (1992) Vitamin K and human nutrition. *J Am Diet Assoc* 92: 585-590.

Suttie, J. W. (1985) Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem* 54: 459-477.

Suttie, J. W., Mummah-Schendel, L. L., Shah, D. V., Lyle, B. J., & Greger, J. L. (1988) Vitamin K deficiency from dietary vitamin K restriction in humans. *Am J Clin Nutr* 47: 475-480.

Suzuki, S., Iwata, G., & Sutor, A. H. (2001) Vitamin K deficiency during the perinatal and infantile period. *Semin Thromb Hemost* 27: 93-98.

Thijssen, H. H., & Drittij-Reijnders, M. J. (1994) Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4. *Br J Nutr* 72: 415-425.

Thijssen, H. H., & Drittij-Reijnders, M. J. (1996) Vitamin K status in human tissues: tissue-specific accumulation of phylloquinone and menaquinone-4. *Br J Nutr* 75: 121-127.

Thijssen, H. H., Drittij-Reijnders, M. J., & Fischer, M. A. (1996) Phylloquinone and menaquinone-4 distribution in rats: synthesis rather than uptake determines menaquinone-4 organ concentrations. *J Nutr* 126: 537-543.

Trousseau, A. (1872) Lectures on clinical medecine delivered at the Hotel-Dieu, Paris, London: The New Sydenham Society: 282-332.

Trumbo, P., Yates, A. A., Schlicker, S., & Poos, M. (2001) Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc* 101: 294-301.

Tsaioun, K. I. (1999) Vitamin K-dependent proteins in the developing and aging nervous system. *Nutr Rev* 57: 231-240.

Ueno, H., Nakamura, H., Inoue, M., Imai, K., Noguchi, M., Sato, H., Seiki, M., & Okada, Y. (1997) Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 57: 2055-2060.

- Varnum, B. C., Young, C., Elliott, G., Garcia, A., Bartley, T. D., Fridell, Y. W., Hunt, R. W., Trail, G., Clogston, C., Toso, R. J., & et al. (1995) Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature* 373: 623-626.
- Vermeer, C. (1990) Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem J* 266: 625-636.
- Vermeer, C., Gijsbers, B. L., Craciun, A. M., Groenen-van Dooren, M. M., & Knapen, M. H. (1996) Effects of vitamin K on bone mass and bone metabolism. *J Nutr* 126: 1187S-1191S.
- Vermeer, C., Jie, K. S., & Knapen, M. H. (1995) Role of vitamin K in bone metabolism. *Annu Rev Nutr* 15: 1-22.
- Vermeer, C., & Schurgers, L. J. (2000) A comprehensive review of vitamin K and vitamin K antagonists. *Hematol Oncol Clin North Am* 14: 339-353.
- Vervoort, L. M., Ronden, J. E., & Thijssen, H. H. (1997) The potent antioxidant activity of the vitamin K cycle in microsomal lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 54: 871-876.
- von Kries, R. (1991) Neonatal vitamin K. *Bmj* 303: 1083-1084.
- von Kries, R., Gobel, U., Hachmeister, A., Kaletsch, U., & Michaelis, J. (1996) Vitamin K and childhood cancer: a population based case-control study in Lower Saxony, Germany. *Bmj* 313: 199-203.
- Wallin, R., & Martin, L. F. (1985) Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K metabolism in liver. Effects of warfarin. *J Clin Invest* 76: 1879-1884.
- Webster, W. S., Vaghef, H., Ryan, B., Dencker, L., & Hellman, B. (2000) Measurement of DNA damage by the comet assay in rat embryos grown in media containing high concentrations of vitamin K(1). *Toxicol In Vitro* 14: 95-99.
- Whitlon, D. S., Sadowski, J. A., & Suttie, J. W. (1978) Mechanism of coumarin action: significance of vitamin K epoxide reductase inhibition. *Biochemistry* 17: 1371-1377.
- Wright, I.S. (1952) The pathogenesis and treatment of thrombosis. *Circulation* 5: 161-188.
- Yanagita, M., Ishimoto, Y., Arai, H., Nagai, K., Ito, T., Nakano, T., Salant, D. J., Fukatsu, A., Doi, T., & Kita, T. (2002) Essential role of Gas6 for glomerular injury in nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest* 110: 239-246.

Yu, Q., & Stamenkovic, I. (1999) Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 13: 35-48.

Zacharski, L. R., Henderson, W. G., Rickles, F. R., Forman, W. B., Cornell, C. J., Jr., Forcier, R. J., Edwards, R., Headley, E., Kim, S. H., O'Donnell, J. R., O'Dell, R., Tornyo, K., & Kwaan, H. C. (1981) Effect of warfarin on survival in small cell carcinoma of the lung. Veterans Administration Study No. 75. *Jama* 245: 831-835.

Zusman, I., Gurevich, P., Madar, Z., Nyska, A., Korol, D., Timar, B., & Zuckerman, A. (1997) Tumor-promoting and tumor-protective effects of high-fat diets on chemically induced mammary cancer in rats. *Anticancer Res* 17: 349-56.

